В.С. АСАТИАНИ

Ферментные методы анализа



АКАДЕМИЯ НАУК ГРУЗИНСКОЙ ССР

В. С. АСАТИАНИ

Ферментные методы анализа



ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»
Москва 1969

УДК 577.1.577.15

Ферментные методы анализа. Асатиани В. С. М., «Наука». 1969.

В книге рассматриваются: действие ферментов в живой клетке и наследственные ферментопатии, современные методы лабораторно-клинической диагностики, основанные на определении ферментов в крови и других биологических жидкостях и тканях. Описаны свойства и роль в организме отдельных (более 100) ферментов. Дается детальное описание количественных ферментных методов, позволяющих определять вещества в биологическом материале без предварительного отделения их от сопутствующих веществ.

Приводятся данные о биохимических нормативах крови и тканей человека и лабораторных животных, сведения о ферментативной активности жидкостей и тканей организма, основных методах, применяемых при работе с ферментами, точности методов и статистической обработке результатов, а также получении препаратов некоторых ферментов.

Книга предназначена для биохимиков, врачей, химиков и биологов широкого профиля.

2-10-2
320-68 (II)

ОГЛАВЛЕНИЕ

Часть III

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Владимир Самсонович Асатиани

Ферментные методы анализа

Утверждено к печати Институтом фармакохимии Академии наук Грузинской ССР

Редактор *Э. Д. Михлин*. Редактор издательства *Л. Н. Кузьминова*.
Художник *Н. Б. Старцев*. Технический редактор *О. Г. Ульянова*

Сдано в набор 30/IX. 1968 г. Подписано к печати 25/IV 1969 г. Формат 60×90[1]/16
Бумага № 2 Усл. печ. л. 46,25 Уч.-изд. л. 46,6 Тираж 7000
Т-06461 Тип. зак. 1371
Цена 3 р.

Издательство «Наука» Москва К-62, Подсосенский пер., 21

2-я типография издательства «Наука» Москва Г-99, Шубинский пер., 10

ОТ АВТОРА

Применение ферментов в качестве химических реактивов исключительно перспективно в свете огромных задач, стоящих перед современной биохимией. Ферментные методы анализа, несомненно, способствуют повышению технического уровня исследований. Однако эти методы все еще недостаточно внедрены в практику отечественных биохимических лабораторий. Одна из причин этого кроется в отсутствии монографического труда с обобщением и систематизацией методов, описания которых разбросаны по многочисленным периодическим изданиям.

Автор сделал попытку заполнить указанный пробел хотя бы частично, насколько это возможно в рамках однотомника. При этом автор не ограничился детальным изложением только тех методов, которые оправдали себя в практике лабораторных исследований. В книге дается также краткое описание методов, представляющих известный интерес с аналитической точки зрения, но пока мало используемых.

Наряду с анализом при помощи ферментов в книге уделяется значительное внимание и методам определения активности самих ферментов в биологическом материале, что представляет особый интерес для биохимиков, врачей и биологов.

Автор отчетливо представляет себе, что при изложении столь обширного материала неизбежны отдельные недостатки. Поэтому любые критические замечания и пожелания будут приняты с благодарностью.

За дружескую помощь в проверке некоторых методов, составлении библиографии и подготовке рукописи автор приносит сердечную благодарность доктору биологических наук Т. П. Пичхая, кандидату биологических наук Л. Т. Рамишвили, научным сотрудникам руководимой им лаборатории А. К. Агеевой, М. А. Альтшуль, Н. Н. Джгамадзе, Л. Д. Имнадзе, Л. С. Силагадзе, В. П. Чантурая, аспирантам М. Б. Джанелидзе, Я. П. Лежава, М. Г. Ткешелашвили, а также М. И. Бердзенишвили и Л. Д. Звиададзе.

Примечание. В тексте термины «слепой», «пустой», «холостой» опыт означают одно и то же понятие. Под названием «вода» подразумевается «дистиллированная вода», если нет других обозначений, как «бидистиллированная», «деионизованная», «водопроводная» и т. д.

Термин «в в» означает вес на вес, «в/о» — вес на объем; «аликвота» — определенная часть анализируемого раствора.

Основные сведения относительно общих методов лабораторных работ (приготовление титрованных и буферных растворов, титрование, взвешивание, фильтрование, центрифугирование и др.), а также специальных методов анализа можно получить из следующих руководств отечественных авторов:

Асатиани В. С. Практическое руководство по биохимической методике. Тбилиси, Грузмедгиз, 1937.

Асатиани В. С. Биохимическая фотометрия. М., Изд-во АН СССР, 1957.

Петрунькина М. Л. и Петрунькина А. М. Практическая биохимия. М., Медгиз, 1951.

Мешкова Н. П. и Северин С. Е. Практикум по биохимии животных. М., «Сов. наука», 1950.

Балаховский С. Д. и Балаховский И. С. Методы химического анализа крови. М., Медгиз, 1953.

ЧАСТЬ I

Введение

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О ФЕРМЕНТАХ

Всякое химическое превращение связано с качественным скачком — одни вещества исчезают, другие появляются.

Одной из наиболее важных особенностей химических реакций является их скорость.

Скорости реакций могут очень сильно отличаться одна от другой. Как известно, они зависят от ряда факторов, в том числе от концентрации, температуры, а также от катализаторов, присутствие которых может оказывать решающее влияние на скорость химических реакций.

Как объяснить каталитическое действие? Прежде всего для того чтобы содержащиеся в системе вещества могли вступить в химическую реакцию, они должны обладать к моменту столкновения достаточной энергией. Ту энергию (вернее, тот избыток над средней энергией молекулы), которой должны обладать вступающие во взаимодействие частицы, чтобы реакция могла осуществиться, называют энергией активации. Другими словами, энергия активации необходима для возбуждения молекул, так как в химическое взаимодействие вступают молекулы веществ, находящихся в возбужденном (активном) состоянии. Ускорение химической реакции катализатором и состоит в том, что его присутствие создает условия, при которых для взаимодействия веществ требуется меньший избыток энергии; следовательно, катализатор снижает энергию активации. Чем больше понижение энергии активации, тем эффективнее катализатор.

Явление катализа еще не получило полной разгадки. Иногда катализатор вступает с реагирующим веществом (субстратом) в химическое взаимодействие, образуя «промежуточные продукты»[1]. Реакция идет как бы по круговому процессу, и катализатор — участник этого процесса. Благодаря такому обходному пути возможность осуществления реакции намного облегчается, а «промежуточные продукты» требуют меньшей энергии активации. В процессе дальнейших превращений эти промежуточные продукты легко распадаются, причем катализатор восстанавливается. Таким образом, ферментная

[1] Не исключена возможность, что не только фермент изменяет состояние субстрата (вещества, химические превращения которого он вызывает), но и субстрат изменяет состояние фермента.

реакция обычно протекает так, что сперва молекула субстрата присоединяется к ферменту. Это происходит очень быстро, и начальная связь фермента с субстратом очень слаба. Далее реакция несколько замедляется, проходя через ряд переходных состояний, молекула субстрата активируется, образуя фермент-субстратные промежуточные комплексы. Интересно, что некоторые ферменты в природе встречаются как бы в виде таких фермент-субстратных комплексов.

Если все реагирующие вещества и сам катализатор находятся в растворенном состоянии, катализ называют гомогенным. Реакции с участием ферментов, представляющих собой молекулы сложных белков, часто протекают в условиях, когда между ними и растворенными реагирующими веществами имеется как бы граница раздела. Такой катализ называют гетерогенным. Но ферментные реакции могут протекать и как гомогенный катализ.

Фермент связывается с субстратом благодаря химическому сродству, которое осуществляется наличием в молекуле фермента остатков различных аминокислот. При этом молекула субстрата связывается только с какой-либо частью молекулы фермента, которая в сотни раз крупнее ее.

Возможно, что катализаторы-ферменты ускоряют (или замедляют) ход уже начавшейся химической реакции. Иногда скорость протекания подобных реакций настолько мала, что на первый взгляд в отсутствие ферментов они не происходят. Существует мнение, что ферменты обладают способностью и «начинать» эти реакции. Фермент настолько повышает скорость какой-либо одной реакции, что она идет по определенному пути. Это очень важное свойство ферментов.

Что такое скорость ферментной реакции? Очевидно, изменение концентрации исходных веществ, между которыми протекает реакция, катализируемая ферментом, за определенное время, т. е. скорость ферментной реакции (V), равна: $V = -\frac{\Delta [S]}{\Delta t}$, где S — концентрация исходного вещества, t — время.

Скорость ферментной реакции принято выражать для начального момента, когда $t = 0$; ее называют тогда начальной скоростью. Если по оси ординат нанести изменение концентрации субстрата, а по оси абсцисс — время, то ход ферментной реакции можно выразить графически кривой превращения (кинетической кривой). Начальную скорость реакции определяют по тангенсу угла наклона касательной к начальному отрезку кинетической кривой.

Для измерения скорости ферментной реакции необходимо поддерживать оптимальную (для данного фермента) величину pH при помощи буфера, не влияющего на исследуемую активность, а также определенную температутру, оптимальную для данного фермента. Надо помнить, что для многих ферментов оптимальные величины pH колеблются в очень узких пределах.

Необходимость постоянства температуры диктуется тем, что,

например, повышение ее на 10° может привести к увеличению измеряемой активности фермента в два раза.

Рекомендуется также обеспечивать присутствие необходимых кофакторов, иногда и стабилизаторов, что детально описано в соответствующих разделах книги. Следует также помнить, что, хотя повышение концентрации субстрата ведет (до известного предела) к ускорению реакции, избыток субстрата нередко может тормозить активность фермента [1].

Для характеристики ферментных реакций очень важно понятие о константе скорости реакции K, которая, при прочих равных условиях (температура, состав среды), не зависит от концентрации реагирующих веществ, но определяется их химической природой.

Простейшую ферментную реакцию можно выразить уравнением

$$E + S \underset{K_{-1}}{\overset{K_{+1}}{\rightleftarrows}} ES \xrightarrow{K_{+2}} E + P,$$

где S — субстрат, образующий с ферментом E так называемый комплекс Михаэлиса. Реакция обратима: K_{+1} — константа скорости образования комплекса, K_{-1} — константа скорости обратного его распада, K_{+2} — константа, характеризующая скорость ферментативной реакции, P —конечный продукт реакции. Зависимость скорости ферментной реакции от концентрации фермента и субстрата выражают уравнением Михаэлиса—Ментена, согласно которому скорость реакции при данной концентрации субстрата (обязательно существенно превышающей концентрацию фермента) линейно зависит от концентрации фермента:

$$V = \frac{K_{+2}[E]_0}{K_m + [S]_0},$$

где V — скорость реакции, K_{+2} — мономолекулярная константа, характеризующая скорость ферментативной реакции, $[E]_0$ — общая концентрация фермента, $[S]_0$ — общая концентрация субстрата, K_m — так называемая константа Михаэлиса, имеющая размерность концентрации (обычно М). Эта константа численно равна концентрации субстрата (в *молях* на *литр*), при которой скорость ферментной реакции равна половине максимальной (т. е. $K_m = [S]_0$ при $v_0 = V/2$).

Сведения о ферментных реакциях и способах работы с ферментами можно найти в книге «Ферменты» под редакцией академика

---

[1] При малых концентрациях субстрата скорость ферментативной реакции невелика, так как условия для столкновения молекул здесь неблагоприятны, и, кроме того, в реакцию вовлекается не все количество фермента. С увеличением концентрации субстрата сперва наступают оптимальные условия, а затем, при дальнейшем увеличении концентрации субстрата, действие фермента начинает замедляться.

А. Е. Браунштейна (изд-во «Наука», 1964) и в книге М. В. Волькенштейна «Молекулы и жизнь» (изд-во «Наука», 1965).

Название «фермент» происходит от латинского «ферментум» — брожу, бродило, закваска. Еще в начале XVII века И. Ван Гельмонт, наблюдая алкогольное брожение, назвал ферментом неизвестную ему причину этого процесса. Несколько позднее было высказано предположение, что фермент — это вещество, обладающее способностью переносить свое внутреннее движение на сбраживаемое вещество. А в конце XVIII века брожение определяли как разложение одного вещества другим. Но все это были малообоснованные догадки, не подкрепленные фактами. Даже когда Спалланцани в 1783 г. открыл, что под действием желудочного сока хищных птиц мясо разжижается, он не сумел объяснить это явление. В начале XIX века (1811, 1814 гг.) Кирхгоф впервые сообщил об ускорении химической реакции. Речь шла о разложении (гидролизе) крахмала под влиянием веществ (экстракта из проростков семян), оставшихся при этом неизменными. В 1836 г. Берцелиус, подметив сходство между ферментативными превращениями сахара при брожении и явлениями катализа, предположил (пока еще только теоретически), что ферменты являются катализаторами таких жизненных процессов, как алкогольное брожение. Именно Берцелиус назвал катализом явление ускорения реакции в присутствии веществ, остающихся в конце реакциине измененными.

Как уже упоминалось, для осуществления химической реакции между двумя видами молекул необходимо, чтобы молекулы получили дополнительное количество энергии (так называемую энергию активации). Это помогает им преодолеть определенный «энергетический барьер» и перейти в активное состояние. Сущность действия катализатора в том, что он снижает энергию активации, необходимую для данной химической реакции, направляя ее, так сказать, обходным путем через промежуточные реакции. Эти реакции требуют гораздо меньшей энергии, чем реакция, идущая без участия катализатора. Поэтому они протекают значительно быстрее, благодаря чему повышается и скорость основной катализируемой реакции. Под действием фермента ослабляются внутримолекулярные связи в субстрате вследствие некоторой деформации его молекулы, происходящей при образовании промежуточного комплекса фермент-субстрата. Это обстоятельство делает молекулу значительно более способной к определенной реакции [1a] и ускоряет ее течение.

Образование фермент-субстратных комплексов может проходить при участии самых различных типов связей: ковалентных, координационных, ионных, электростатических и других. Молекулы фермента в растворе постоянно деформируются, изменяя свою конфигурацию в пространстве (так называемую третичную структуру), другими словами, они образуют ряд конфигурационных

(и ионизационных, выражающихся в изменении распределения зарядов вокруг ионогенных группировок) изомеров.

Во многих случаях ферменты, являющиеся как будто гомогенными белками, удается при помощи электрофореза разделить на несколько молекулярных форм, которым дали общее название — изоферменты. Изоферменты обнаружены как в животных, так и в растительных тканях. Такая множественность молекулярных форм фермента (лактатдегидрогеназа существует в виде пяти изоферментов), катализирующих одну и ту же реакцию, но различающихся по электрофоретическим и иммунологическим свойствам, уже используется для диагностики различных болезней.

Уже в первой половине прошлого столетия ученым удалось не только выделить из ячменного солода фермент, открытый Кирхгофом, но и открыть присутствие других ферментов: эмульсина в горьких миндалях, пепсина в желудочном соке, трипсина в соке поджелудочной железы, но природа их еще долгое время оставалась невыясненной, частично из-за неудачи, постигшей такого ученого, как Луи Пастер.

Изучая широко распространенный в природе ферментативный процесс алкогольного брожения, Пастер пришел к правильному выводу о том, что «брожение есть жизнь без воздуха, без свободного кислорода». Но Пастер не сумел доказать, что брожение возможно и без живых дрожжевых клеток.

Это впервые удалось М. М. Манассеиной, а затем Э. Бухнеру. Манассеина растирала дрожжи с горным хрусталем. Бухнер разрушал дрожжевые клетки растиранием с кварцевым песком, после чего отжимал под большим давлением. В обоих случаях был получен сок, не содержащий клеток, но обладающий способностью сбраживать сахар, т. е. содержащий ферменты. После исследований Манассеиной многие ученые все же продолжали считать ферменты, выделяемые клетками наружу, чем-то принципиально отличным от внутриклеточных ферментов.

В начале нашего века изучением ферментов занялся Р. Вильштеттер, который сделал очень много для выявления их свойств, но сделал глубоко ошибочный вывод, что ферменты не принадлежат ни к одному из известных науке классов органических соединений.

Вильштеттер не обратил должного внимания на труды таких ученых, как А. Я. Данилевский и И. П. Павлов, содержавшие ясные указания на белковую природу ферментов. К тому времени были известны открытия И. П. Павлова, произведшие полный переворот в учении о пищеварении и пищеварительных ферментах. Исключительно наглядными опытами И. П. Павлов и его ученики показали, что чем больше белка в желудочном соке, тем выше ферментативная активность сока; содержание фермента всегда точно соответствовало содержанию белка.

Позднее Дж. Самнер, затем Д. Нортроп и другие исследователи получили ряд ферментов (в настоящее время их около 150) в кристаллическом состоянии, т. е. в особо чистом виде, и доказали, что

эти ферменты являются белками. Сейчас термины «фермент» и «энзим» используются как однозначные, так как установлено, что никаких различий между внутриклеточными и внеклеточными ферментами нет. Фермент можно определить как белок-катализатор, способный специфически активировать другие вещества.

Установление белковой природы ферментов — факт чрезвычайной и принципиальной важности.

Большинство всех непрерывно происходящих в организме химических превращений протекает при участии ферментов, являющихся белками. Становится понятным, почему жизнь без этих биологических катализаторов невозможна.

Какие же свойства ферментов делают их основой жизни?

В первую очередь, конечно, их каталитические свойства, другими словами, способность резко изменять (обычно в сторону повышения) скорость химических превращений. Для проявления действия ферментов достаточно самого незначительного их количества. Последнее обстоятельство резко отличает биологические катализаторы от катализаторов, применяемых химиками, несмотря на то, что и здесь катализатор берется в очень малых количествах по сравнению с количествами катализируемых им веществ. Приведем пример. Для разложения перекиси водорода на воду и кислород достаточно буквально следов трехвалентного железа. Но ту же реакцию может катализировать фермент каталаза, причем активность этого фермента в 20 миллионов раз больше каталитической активности железа. Другими словами, если взятое количество перекиси водорода в присутствии железа разложится на воду и кислород за 2 секунды, то в присутствии фермента скорость химической реакции возрастает настолько, что на это уйдет лишь одна десятимиллионная часть секунды. Скорость химической реакции можно измерить по количеству вещества, разложившегося (или образовавшегося) за одну секунду.

Химики считают скорость химической реакции одним из самых важных показателей, от которого зависит возможность ее практического использования, и прилагают все усилия для повышения скорости реакции путем подбора наилучших, наиболее активных катализаторов.

Высокая активность весьма характерна для биологических катализаторов, действующих в живых организмах, в которых идет непрерывный обмен веществ. По некоторым данным, каждая молекула фермента в течение 2 секунд при температуре 37° может привести в движение около 500 молекул вещества (субстрата), на которое она воздействует. Можно утверждать, что, не будь необычайной скорости, с которой в организмах совершаются реакции химических превращений, не было бы и самой жизни.

Современной химии известны все эти реакции; они не так уж сложны и довольно однообразны — окисление, восстановление, расщепление с присоединением воды (гидролиз) и т. д. Каждую из этих реакций можно осуществить в лаборатории, но не с такой

скоростью, как это происходит в клетках и тканях организма. Основную часть сухого веса живых существ составляют органические вещества. К органическим веществам относятся белки, жиры, углеводы и др., которые входят в состав пищи человека и подвергаются разложению в пищеварительных путях. Из обломков молекул этих веществ организм воссоздает новые молекулы, которые ему необходимы для поддержания процессов обмена, для роста и т. д.

С точки зрения химика, органические соединения отличаются от неорганических не только тем, что в основе первых лежит элемент углерод, но и некоторыми свойствами, из коих одно из самых характерных — это то, что молекулы органических соединений химически относительно инертны, их трудно побудить к химическим реакциям. Конечно, химик может «подхлестнуть» эти соединения, но ему придется прибегнуть к действию высокой температуры или высокого давления, или же крепких кислот. Но высокие температуры, давление и крепкие кислоты немыслимы в клетках живого организма, и тут на сцену выступают ферменты, обеспечивающие необходимые скорости химических превращений.

Вернемся еще к одному любопытному свойству ферментов как катализаторов. Химические превращения могут быть обратимы: если какое-либо вещество подвергается распаду, то при определенных условиях продукты этого распада могут, соединяясь, образовать исходное вещество; другими словами, если написать эту реакцию, она может протекать как слева направо, так и справа налево. Направление реакции зависит главным образом от количества (концентрации) начальных и конечных продуктов химической реакции. Как и обычные катализаторы, ферменты могут ускорять как прямую, так и обратную реакцию.

Это свойство ферментов помогает нам уяснить себе механизм химических превращений, протекающих в клетках и тканях организма. В присутствии воды, находясь в растворе, содержащиеся в клетках ферменты могут ускорять реакции расщепления пищевых веществ с присоединением к ним воды (реакции гидролиза); но, концентрируясь на тончайших образованиях в протоплазме клетки, те же самые ферменты уже не расщепляют, а, наоборот, воссоздают, синтезируют из продуктов распада более сложные вещества.

В этом отношении хорошо изучены, например, внутриклеточные ферментативные превращения гликогена, в процессе распада которого с образованием молочной кислоты принимает участие более десяти ферментов. Оказалось, что действие ряда ферментов, катализирующих отдельные промежуточные реакции распада гликогена, может быть обратимым. Таким образом, в тканях (мышцах, печени) происходит как распад гликогена с образованием из него молочной кислоты, так и образование гликогена из молочной кислоты.

Такая созидающая роль ферментов была открыта в прошлом веке А. Я. Данилевским, указавшим на огромную роль ферментативного синтеза в обмене веществ живого организма и подтвердившим

экспериментально, что один и тот же фермент может осуществлять распад и синтез.

Как было сказано выше, ферменты являются специфическими белками, т. е. высокомолекулярными соединениями. Остановимся на некоторых свойствах таких соединений.

Мы уже упоминали, что характерной особенностью ферментов является также их чувствительность к температуре, особенно к высокой (выше 70—80°). Это свойство ферментов не кажется неожиданным: все ферменты являются белками, а для белков характерно, что они сильно изменяются (денатурируются) под действием высокой температуры.

Чувствительность к нагреванию у ферментов проявляется чаще всего таким образом: вначале (до температуры порядка 40—50°) нагревание повышает способность ферментов ускорять химические реакции, катализировать их. Дальнейшее нагревание начинает снижать эту активность (большую роль при этом играет также и длительность нагревания). Нагревание выше 90° ведет обычно к катастрофическим результатам: ферменты полностью утрачивают свои каталитические свойства, так как при этом денатурируется белок, входящий в состав фермента. Однако наблюдаются и некоторые исключения. Так, например, содержащийся в мышцах фермент миозин легко выдерживает нагревание до 100°. Другими словами, ферменты большей частью термолабильны, но встречаются и термостабильные ферменты. Некоторые ферменты при нагревании как бы временно лишаются активности. После прекращения нагревания с течением времени такой фермент может восстановить утраченные каталитические свойства.

Для каждого фермента существует оптимальная для его действия температура, при которой ($t^{\circ}_{опт}$) наблюдается максимальная скорость реакции. Естественно, что для ферментов в организме теплокровных животных наиболее благоприятна температура тела этих животных (37—40°). При этом различные ферменты относятся к повышению температуры по-разному, и это обстоятельство сумели использовать химики. Например, фермент рибонуклеаза более устойчив к действию температуры и это дало возможность отделить ее от примесей других белков-ферментов и получить в чистом виде. А вот фермент лактикодегидрогеназа, содержащийся в мышце нашего сердца, устойчивее к температуре, чем тот же фермент из печени; в некоторых случаях это помогает решить вопрос, какого происхождения фермент (лактикодегидрогеназа), встречающийся в плазме крови.

Зависимость скорости ферментной реакции от температуры (когда тепловая денатурация еще не выражена) можно описать уравнением $\frac{d \ln K}{dT} = \frac{E}{RT^2}$, где K — константа скорости реакции, T — абсолютная температура, R — газовая постоянная, E — энергия активации. Измеряя скорость ферментной реакции и пользуясь этим уравнением, можно определить величину энергии активации ферментной реакции. При этом надо помнить, что ферменты in vitro заметно

инактивируются при сравнительно невысоких температурах. По рекомендации комиссии по ферментам, работать с ферментами надо, когда это возможно, при 30° [13].

Ферменты очень чувствительны и к кислотности среды; оптимальное значение pH неодинаково для различных ферментов. Одни ферменты обладают наибольшей активностью при слабокислой реакции, другие — при слабощелочной или нейтральной. Это свойство ферментов позволяет нам легко понять, например, процесс пищеварения. Реакция слюны почти нейтральная и именно при этой реакции наибольшей активностью обладает фермент, который содержится в слюне. Этот фермент (амилаза) действует только на углеводы, в основном на крахмал; поэтому в полости рта начинается ферментативное переваривание только углеводной части пищи.

Из полости рта пища попадает через пищевод в желудок. Здесь выделяется желудочный сок, представляющий собой чрезвычайно кислую жидкость, равной которой по кислотности в живом организме нет. Этот сок содержит фермент пепсин, проявляющий максимум активности только при кислой реакции среды. Он расщепляет белки, но не действует на углеводы. Что же происходит в желудке? Кислый сок, выделяющийся из специальных желез в стенках желудка, постепенно пропитывает пищу, расщепляя главным образом белки. Углеводы (крахмал) перевариваются под влиянием ферментов слюны, попавшей в желудок вместе с пищей. Однако в присутствии кислого желудочного сока ферменты слюны перестают действовать. Поэтому расщепление углеводов в желудке практически приостанавливается. Переваривание пищи происходит лишь в тех участках желудка, куда проник кислый сок.

По мере переваривания пища постепенно поступает из желудка в тонкие кишки через двенадцатиперстную кишку, в которую впадают два протока большой пищеварительной железы, расположенной под желудком.

Сок поджелудочной железы представляет собой щелочную жидкость и содержит ферменты, действующие уже на все три основные группы питательных веществ — белки, углеводы и жиры, проявляющие наибольшую активность при щелочной реакции среды.

Тем обстоятельством, что для каждого фермента существует оптимальная величина pH, пользуются для проявления активности того или иного фермента.

Специфичность действия ферментов

Специфичность действия ферментов выражается в том, что каждый фермент действует лишь на вполне определенное вещество (субстрат) или же на определенный тип химической связи в молекуле.

Фермент изменяет состояние субстрата, но и субстрат изменяет геометрическое строение молекулы фермента; при этом их взаимодействие протекает так, что определенные субстрат и фермент как бы подгоняют себя друг к другу для обеспечения тесного контакта.

Именно такая гибкость молекул обеспечивает специфичность фермента по отношению к субстрату.

Хотя эта специфичность и не абсолютна, но все же она представляет очень важное свойство ферментов. Ниже мы еще вернемся к этому свойству ферментов.

Собственно говоря, и химики пытаются подобрать для каждой каталитической реакции, осуществляемой в лаборатории, какой-то наилучший катализатор.

Но, в отличие от живого организма, многие химические реакции могут катализироваться в лаборатории различными катализаторами или же один катализатор используется для ускорения различных химических реакций. Не то мы наблюдаем в живом организме: здесь определенный фермент обычно ускоряет только какую-либо реакцию или небольшой круг сходных по типу химических реакций. Можно различать несколько видов специфичности. Абсолютно специфичен фермент, катализирующий только одну реакцию превращения определенного субстрата. При групповой специфичности фермент приспособлен к типу химической реакции и может катализировать превращения нескольких субстратов, построенных по одному типу. Относительная групповая специфичность проявляется ферментами, действующими на определенные связи в молекулах.

Это дало возможность упорядочить наименование многочисленных ферментов, известных , в настоящее время[1].

Так, например, очень большую группу ферментов, ускоряющих гидролиз, т. е. расщепление при участии воды различных сложных органических соединений на более простые, именуют гидролазами. В группе гидролаз в свою очередь различают несколько подгрупп. Ферменты одной из этих подгрупп вызывают расщепление белков (протеинов) при участии воды и их называют протеиназами или протеолитическими ферментами. Из широко известных протеиназ упомянем пепсин, входящий в состав желудочного сока и с пособствующий перевариванию мяса и других белков в желудке; трипсин — фермент, продолжающий в кишечнике переваривание белков, начавшееся в желудке; катепсин, расщепляющий белки в тканях человека или животных; папаин — фермент растительного происхождения, получаемый из млечного сока плодов дынного дерева.

Вторую группу гидролаз составляют карбогидразы — ферменты, под влиянием которых происходит присоединение воды к углеводам (карбогидратам) с последующим расщеплением их на более простые углеводы. Сюда относится фермент сахараза, или инвертаза, под действием которого молекула обычного тростникового (свекловичного) сахара присоединяет частицу воды и распадается

[1] Обычно ферменту дают название, прибавляя окончание «аза», либо к латинскому корню наименование вещества (субстрата), на которое действует фермент, либо к названию процесса, который катализируется данным ферментом. Наряду с этим пока еще много ферментов с произвольными, исторически сложившимися и устоявшимися названиями. В новейшее время в названии фермента стараются отразить механизм его действия.

на более простые сахара: виноградный (глюкозу) и плодовый (фруктозу). К карбогидразам относится и впервые открытый Кирхгофом фермент амилаза, катализирующий гидролитический распад крахмала (лат. «амилум») с образованием более простых углеводов— декстринов и солодового сахара (мальтозы). Действие амилазы нам известно из повседневной жизни не только потому, что амилаза (птиалин) содержится в слюне, под влиянием которой углеводы пищи начинают перевариваться уже в полости рта, но и по другим примерам; в частности, амилаза играет большую роль и в растениях, где под ее воздействием крахмал, выполняющий роль запасного пищевого вещества, превращается в более простой по составу солодовый сахар—мальтозу, используемую в процессах обмена веществ в растительном организме.

Третью подгруппу гидролаз составляют эстеразы, под влиянием которых так называемые сложные эфиры (эстеры) присоединяют воду и распадаются на более простые составные части. Основное значение эстераз в животном организме в том, что они катализируют распад жиров на глицерин и соответствующие жирные кислоты.

Кроме гидролаз, большую роль в химических превращениях в живой природе играют и ферменты, относящиеся к другим группам: ферменты расщепления, ускоряющие расщепление многих веществ (сахар и др.) на более простые соединения (а также ускоряющие обратные реакции синтеза), ферменты переноса различных группировок атомов с одного соединения на другое, окислительно-восстановительные ферменты, катализирующие многообразные реакции окисления и восстановления, наблюдаемые в живом организме (такие реакции, например, лежат в основе дыхания и брожения).

Международный Союз биохимиков принял следующее подразделение ферментов на классы: 1) оксидоредуктазы, катализирующие процессы биологического окисления; 2) трансферазы, переносящие группы атомов; 3) гидролазы, катализирующие расщепление с присоединением воды; 4) лиазы, отщепляющие (или присоединяющие) различные группы без участия воды; 5) изомеразы, изменяющие структуру соединения («изомеразные»); 6) лигазы, связывающие две молекулы при разрыве связи в некоторых соединениях фосфорной кислоты.

Большая специфичность ферментов — явление весьма примечательное. Она проявляется и в действии ферментов на оптически активные вещества. Что представляют собой эти вещества? Еще Пастер заметил, что оптически активные вещества, находящиеся в растворе, выделяются в виде таких кристаллов, которые по оптическим свойствам представляют зеркальное изображение друг друга (правовращающая и левовращающая формы). Молекулы этих веществ не отличаются друг от друга ничем, никакими физическими или химическими свойствами, кроме одного: если одна вращает плоскость поляризованного луча света вправо, то другая — влево. Но ферменты оказываются настолько чувствительными, что этого

ничтожного различия для них достаточно. Так, например, ферменты спиртового брожения сбраживают только правовращающие формы виноградного или плодового сахара и совершенно не затрагивают левовращающие формы этих сахаров.

Такую же специфичность ферменты проявляют и когда катализируют синтез различных веществ. Еще Пастер пришел к выводу, что основной особенностью живого вещества является способность к синтезу оптически активных органических соединений. Таким образом, это свойство ферментов приобретает очень важное значение для всей науки о жизни. Именно оно дало повод сравнить фермент и субстрат с ключом и соответствующим замком.

Особенно четко выражена специфичность действия ферментов, осуществляющих синтез белков — этой первоосновы всего живого. Необходимо подчеркнуть необычайную способность участвующих в синтезе ферментов «узнавать» одну аминокислоту среди двух десятков прочих, и более того, распознавать именно ту РНК (среди минимум 20 ее разновидностей), которая соответствует данной аминокислоте. Но исключительная разборчивость ферментов представляет интерес не только для биолога. Ведь ферменты — прежде всего катализаторы, а катализ имеет огромнейшее значение в современной промышленной химии. Несмотря на это, именно те катализаторы, которыми пользуются химики, очень часто оставляют желать лучшего.

Для того чтобы понять механизм действия ферментов, надо сначала изучить их строение, а для этого необходимо иметь ферменты в чистом виде, уметь выделить их из разных органов и тканей. Это оказалось очень трудным делом. В отличие от других химических соединений, для которых получение их в кристаллическом виде является гарантией их чистоты, белки-ферменты весьма прихотливы. Исследователь, радовавшийся получению фермента в виде кристаллов определенной формы, с горечью убеждался в дальнейшем, что эти кристаллы, казалось бы совершенно однородные, представляют смесь из двух и более различных ферментов. В этом сказываются особые свойства белков, не похожих на все остальные вещества, в частности способность кристаллизоваться с другими веществами и друг с другом. Кристаллическое состояние не всегда является верным признаком чистоты белка-фермента. И все же эти трудности преодолеваются при помощи новейших тончайших способов разделения и очистки.

В настоящее время удалось получить ряд ферментов в химически чистом виде. Удалось изучить их строение и подтвердить, что все белки состоят из остатков аминокислот, соединенных при помощи пептидных связей в виде цепей. Молекулы некоторых белков-ферментов состоят из одиночной цепи, других — из нескольких таких цепей. Выяснилось, что многие ферментные белки отличаются друг от друга количеством и природой образующих их аминокислот; с другой стороны, многие ферментные белки имеют один и тот же набор аминокислот и величина их молекул почти одинакова.

Чем же отличаются друг от друга такие ферментные белки? В чем лежит причина их разного, всегда специфичного отношения к субстратам?

На специфичность ферментных белков влияет и порядок чередования в них аминокислот, из которых складывается пептидная цепь. Мы уже знаем аминокислотный состав многих ферментов. Так, например, известно, что молекула фермента рибонуклеазы состоит из 126 аминокислотных остатков, образующих одну пептидную цепь, установлено и то, какие именно аминокислоты образуют эту цепь и в какой последовательности они чередуются. Удалось также выяснить, что специфичность фермента зависит не только от того, как расположены аминокислоты во всей его молекуле. В каждом ферменте имеется своего рода активный центр — небольшой участок пептидной цепи с характерным для него составом и порядком чередования в нем аминокислот.

В современной ферментологии активным центром называют ту часть молекулы белка-фермента, которая соединяется с субстратом (и кофакторами) и от которой зависят ферментные свойства молекулы. Такой центр состоит из ряда функциональных групп. Некоторые из них можно назвать контактными, т. е. непосредственно обеспечивающими связывание субстрата с ферментом, другие образуют каталитически активный участок фермента. Правда, как указывает А. Е. Браунштейн [4], такое разделение, да и самое ограничение активного центра носит относительный, условный характер. Однако не надо думать, что в молекуле фермента «работает» только небольшой кусочек ее — активный центр. В ряде случаев показано, что для проявления ферментативной активности нужна вся молекула белка. Отметим, что активный центр вызывает изменения определенного вещества — субстрата. Одновременно и субстрат, взаимодействуя с активной группой фермента, изменяет геометрическую структуру белка. Но, кроме активного центра, в молекуле фермента имеется химическая группировка, которую могут блокировать, входя с ней в контакт, самые разнообразные соединения, не имеющие никакого родства с субстратом (на который действует активный, «субстратный» центр). И вот, блокируя такую группировку (ее называют «аллостерической» [1]), эти соединения могут воздействовать на общее строение белковой молекулы — ее конформацию [2] и, тем самым, регулировать деятельность активного центра, т. е. основную работу фермента. Среди таких соединений встречаются гормоны, возбудители и регуляторы деятельности важнейших органов нашего тела.

---

[1] Так как взаимодействие фермента с этими соединениями не основано на стерическом соответствии, имеющемся в случае действия ингибитора, который стерически должен соответствовать (быть комплементарным) конфигурации активного центра.

[2] А. Е. Браунштейн [4] считает более правильным называть эти соединения не «аллостерическими ингибиторами», а более конкретно — «конформационными кофакторами».

«Аллостеризм» — прекрасный пример того, как замечательно отрегулированы химические процессы в живой природе. Ферменты, катализирующие химические превращения субстрата, можно назвать живой системой. Получается, что работа регулируемой живой системы зависит от результатов этой работы. Предположим, что живая система состоит из целого ряда химических реакций, каждая из которых катализируется особым ферментом. Конечный продукт не имеет ничего общего с начальным субстратом, но он может блокировать (и в этом случае его называют «ретроингибитором») действие «начального» фермента, катализирующего первую реакцию в цепи данной живой системы. Как назвать это явление? На это можно ответить: «обратной связью». Да, именно той обратной связью, которая лежит в основе самого простого способа регуляции любой машины.

Ферментные белки — это обычные органические соединения, специфичность действия которых зависит от особенностей их химического строения и пространственного расположения (структуры).

Мы уже упоминали, что высокая специфичность биологических катализаторов требует оговорки. Дело в том, что известны случаи, когда один и тот же фермент действует на несколько различных химических субстратов. Интересно, что такие ферменты встречаются в пищеварительном тракте. Это и понятно; пища содержит много разнообразных веществ. Но такие примеры сравнительно редки и разборчивость ферментов, избирательность их действия остается пока наиболее характерным их свойством [1]. Подчеркнем это «пока». Дело в том, что в последние годы получены некоторые довольно неожиданные результаты, несколько поколебавшие уверенность в специфичности действия ферментов. Активность фермента можно повышать или, напротив, подавлять, парализовать действием некоторых химических веществ, часто очень простых по составу. Такие активаторы и ингибиторы действия ферментов могут быть очень специфичными; так, например, соль синильной кислоты резко повышает активность фермента папаина, но совершенно парализует действие дыхательного фермента.

Конечно, мы можем подавить активность фермента (т. е. скорость ферментной реакции) любым способом, вызывающим денатурацию белка (нагревание, действие сильных кислот и оснований и т. п.). Но эти общие способы неспецифичны. Поэтому ингибиторами называют вещества, небольшие количества которых специфически действуют на активные центры ферментов и тормозят деятельность последних. Ингибирование (торможение) ферментных реакций может происходить различным образом. При конкурентном тормо-

[1] Отметим, что в живых организмах (в том числе и человека) встречаются ферменты, которые могут действовать на вещества, не встречающиеся в природе. К ним можно отнести многие лекарственные вещества и яды. Весьма вероятно, что устойчивость болезнетворных микробов к таким лекарственным веществам объясняется тем, что микроорганизмы вырабатывают специальные ферменты, разрушающие эти лекарственные вещества.

жении молекула ингибитора сходна с молекулой субстрата и, оттесняя ее, тормозит реакцию. При неконкурентном торможении (обычно необратимом) ингибитор связывает или разрушает какую-нибудь каталитически активную группу в молекуле фермента. Наконец, ферментную реакцию может тормозить и избыток субстрата.

Для скорости ферментной реакции в присутствии неконкурентного ингибитора (обратимого действия) можно применить следующее математическое выражение [10]:

$$V_i = \frac{K_{+2}[E]_0[S]}{(K_s + [S])\left(1 + \frac{[i]}{K_i}\right)},$$

где V_i — начальная скорость реакции в присутствии ингибитора, V — максимальная скорость реакции, $[E]$ — концентрация фермента, $[S]$ — концентрация субстрата, $[i]$ — концентрация ингибитора, K_s — субстратная константа (константа диссоциации комплекса Михаэлиса,), K_i — константа ингибитора (константа диссоциации фермент-ингибиторного комплекса), K_{+2} — мономолекулярная константа, характеризующая скорость ферментативной реакции. Многие ферменты содержатся в тканях и клетках организма в совершенно неактивном состоянии, но становятся активными при известных условиях. Это впервые показал И. П. Павлов с учениками на примере ферментов пищеварения. Пепсин (фермент желудочного сока) делается активным после того, как его недеятельная, неактивная форма (пепсиноген) активируется соляной кислотой. Общее название неактивных форм ферментов — проферменты (зимогены). В здоровых железах желудка нет готового пепсина, а имеется недеятельный пропепсин. Под влиянием нервных импульсов железы выделяют в полость желудка этот неактивный профермент, который под действием соляной кислоты желудочного сока тут же превращается в пепсин. Образовавшийся пепсин помогает соляной кислоте превращать пепсиноген в пепсин. Так происходит активирование фермента. Здесь роль активатора играет соляная кислота, очень важная для нормального пищеварения.

Иногда активаторы ферментов еще проще по составу, чем соляная кислота. В некоторых случаях для проявления действия фермента достаточно присутствия небольших количеств кальция, марганца, кобальта. Фермент амилаза становится активным в присутствии хлора. В других случаях для активирования фермента клетки нашего тела вырабатывают очень сложные по составу белковые вещества. Фактически такой активатор является ферментом фермента, так как катализирует действие недеятельной до того формы фермента. Так, например, расщепляющий в кишечнике белки фермент трипсин существует в клетках в виде неактивного трипсиногена, который активируется действием так называемой энтерокиназы. Как представить себе сущность активации? В ряде случаев удалось показать, что возникновение активности зависит от первичной структуры

белка. Возьмем тот же трипсиноген. Он неактивен. Но вот от его полипептидной цепочки (первичной структуры) отщепляется отрезок этой цепочки, состоящей из шести «кирпичиков» — остатков аминокислот. И тогда появляется ферментативная активность — трипсиноген становится настоящим трипсином. Как объяснить это? Оказывается, что только после такой «ампутации» первичной структуры соответствующий участок полипептидной цепочки получает возможность закручиваться в спираль и появляется ферментативная активность. Таким образом, для проявления действия ферментов имеет значение не только первичная, но и вторичная, третичная, и, возможно, четвертичная структура их молекулы.

Действие активаторов и ингибиторов играет большую роль в согласованности ферментативных реакций в протоплазме клетки, в регулировании этих реакций. Наряду с этим активность ферментов в живой клетке регулируется и другим путем. Было установлено, что ферменты могут связываться с другими белками и снова освобождаться из таких соединений. Связываясь, ферменты теряют свою активность, освобождаясь — восстанавливают ее. Следовательно, регулирование деятельности ферментов во многом зависит и от способности их оседать на белковых частичках протоплазмы и освобождаться от них. Очевидно, многие ферменты в живой клетке находятся в виде проферментов. Иначе трудно было бы понять, каким образом фермент и субстрат, на который он должен действовать, существуют одновременно в живой клетке. Так, например, в любой растительной клетке нетрудно обнаружить крахмал и рядом с ним амилазу — фермент, который расщепляет крахмал. Возможно также, что между ферментом и субстратом в живой клетке имеются какие-либо пространственные ограничения (границы раздела).

Здесь могут играть роль так называемые антиферменты — вещества, прекращающие или задерживающие действие какого-нибудь фермента. Природа антиферментов пока не выяснена: известно только, что каждый антифермент задерживает действие определенного фермента. Например, выделившийся в нашем желудке пепсин не переваривает клетки «своего» желудка, но если мы будем есть желудок какого-либо животного, то «наш» пепсин будет переваривать его клетки. Очевидно, в клетках желудка содержится антипепсин, мешающий перевариванию их собственным пепсином. Это же можно допустить и в отношении других пищеварительных желез и кишечной стенки, устойчивых к действию «своих» ферментов. Для фермента трипсина известен антифермент—антитрипсин. Соединяясь с трипсином, ингибитором которого он является, антитрипсин предохраняет поджелудочную железу от самопереваривания[1]. Таким антитрипсином обладают гельминты, попадающие в

---

[1] Можно допустить и другое. Известно, что некоторые ферменты присутствуют в клетке в неактивной, «замаскированной» форме. Когда организм умирает, его клетки подвергаются саморазрушению, автолизу. При этом с таких ферментов как бы срывается маска и они становятся активными. Это может произойти и в

наш кишечник и живущие в нем, так как благодаря этому они не перевариваются трипсином сока поджелудочной железы, изливающегося в кишечник. Антитрипсин встречается и в сыворотке крови. Если ввести в организм, прямо в кровь (минуя желудочно-кишечный тракт), какой-либо фермент, то в организме образуется соответствующий антифермент, например антикаталаза или антиуреаза. Антиферменты как бы защищают организм от «нашествия» чуждых ему ферментов, в том числе и ферментов болезнетворных бактерий. В этом случае антиферменты входят в понятие антитела.

Ферменты широко распространены в живой природе. Практически они содержатся во всех живых и растительных тканях. Это позволяет предположить, что все белки организма могут являться ферментами. Такой взгляд подтверждается и открытием, сделанным В. А. Энгельгардтом и М. Н. Любимовой. Как известно, наиболее важной составной частью мышц (не считая воды) являются белки. Главным белком мышц, обусловливающим их способность сокращаться, является миозин. И вот оказалось, что миозин не только сократимый белок мышц, но одновременно и фермент, который катализирует химическую реакцию, доставляющую энергию, необходимую для этого сокращения. Такое «самоснабжение» энергией — факт весьма примечательный. Вполне вероятно, что все белки являются ферментами, но не для всех белков выявлены их ферментативные свойства; возможно и то, что все или почти все белки приобретают каталитические свойства и в определенных условиях становятся ферментами.

Различия между отдельными ферментами сказываются и в том, что хотя все ферменты являются белками, но эти белки могут быть простыми и сложными. Простые белки характеризуются тем, что при расщеплении их не удается получить ничего, кроме аминокислот. Следовательно, их отличие друг от друга заключается в различном наборе и различном порядке чередования аминокислот в молекуле. К простым белкам относится бо̀льшая часть известных ферментов (протеазы, амидазы, карбогидразы, эстеразы). Некоторые ферменты, помимо белка, содержат еще более простые соединения, иногда одни и те же у различных ферментов. Так, например, в составе различных окислительных ферментов содержится органическое соединение железа. В состав других ферментов входят медь, цинк, марганец, ванадий, хром и другие химические элементы (например, сера в составе тиоловой группы). Таким образом, эти ферменты являются сложными белками-протеидами, содержащими небелковые, простетические группы. К протеидам относятся и фосфорилазы.

Простетические группы не обязательно содержат металлы. Несколько десятков лет назад Н. Д. Зелинский [12] предположил, что в состав ферментов могут входить такие широко известные

живом теле с катастрофическими для него последствиями, например при некрозе поджелудочной железы, вызываемом самоактивацией пищеварительных ферментов.

соединения, как витамины. Это предположение оправдалось и уже подтверждено в отношении большинства витаминов. Это очень важное обстоятельство, помогающее часто понять физиологическую роль витаминов.

В роли простетических групп могут выступить и другие органические соединения. Все эти небелковые части ферментов называют коферментами.

Для осуществления реакции, кроме фермента и субстрата, очень часто необходимо еще дополнительное вещество — кофактор, способствующий, например, переносу некоторых химических групп. Кофакторы — это общее название. Когда функцию кофактора выполняет органическое соединение, его называют коферментом. Если кофермент сравнительно прочно присоединен к апоферменту на всем протяжении ферментной реакции, его называют простетической группой. Но есть еще и неорганические вещества (ионы металлов), участие которых необходимо для каталитического действия фермента; они входят в состав активных центров многих ферментов или активируют эти ферменты. Такие вещества можно называть неорганическими кофакторами. Белковую часть молекулы фермента (апофермент) принято называть носителем, а простетическую группу — активной группой. Необходимо, однако, учитывать, что характер, специфичность и самое действие фермента зависят главным образом от природы белкового носителя, соединенного с активной группой. Другими словами, от носителя зависит, на какое именно вещество действует фермент: на углеводы или жиры, на белки или еще какие-нибудь вещества.

Ферменты — простые белки называют однокомпонентными ферментами. Ферменты — сложные белки носят название двухкомпонентных ферментов. Небелковые компоненты таких ферментов, называемые коферментами, иногда легкоотделимы от белка (например, путем диализа), иногда же прочно связаны с белковой частью фермента. Именно эта белковая часть определяет во всех случаях специфические свойства фермента. Кофермент, взятый в отдельности, не обладает ферментативным действием.

Как уже было упомянуто, ферменты играют важнейшую роль в обмене веществ — в этом сложном, непрерывно протекающем в живом организме процессе, с прекращением которого прекращается существование живого организма. Определяя скорость, темп биохимических реакций, ферменты влияют и на их направленность. Благодаря избирательности действия ферментов решающая роль здесь принадлежит им: ведь из многих возможных химических реакций фермент ускоряет (и притом во много раз) обычно лишь одну. Таким образом, ферменты направляют и регулируют химические превращения обмена веществ в организме и обеспечивают его связь с внешней средой, его приспособленность к этим условиям. Важную роль играет и то обстоятельство, что в процессах обмена веществ ферменты изменчивы; они могут возникать, изменяться, терять свои каталитические свойства.

Интересно и то, что многие ферменты существуют в различных формах, обладающих одинаковой каталитической активностью, но отличающихся вторичной или третичной структурой молекулы. Такие различные формы одного и того же фермента носят название изоферментов. Так, например, в сыворотке крови открыто пять электрофоретически различных фракций лактикодегидрогеназы.

Наряду с этим, несмотря на большое количество ферментов, или, вернее, различных ферментных систем в живом организме, тысячи ферментативных реакций в нем протекают удивительно слаженно, не хаотически, а в строго определенной последовательности. Именно такая взаимозависимость и координация действия многочисленных ферментных систем обусловливает нормальное течение химических реакций в здоровом организме.

Поэтому очень важно изучать не только действие отдельных ферментов, но и совокупности ферментных систем в целом. Здесь встречаются трудности, которые постепенно преодолеваются. Мы уже можем себе до некоторой степени представить, как «работают», функционируют ферменты. Можно предположить, что сначала фермент соединяется с субстратом (веществом, на которое фермент действует); образуется как бы промежуточное соединение, которое, распадаясь, дает уже конечный продукт реакции. Молекула самого фермента после этого восстанавливается, хотя и может иногда подвергаться частичному разложению. Связь между действием двух (и многих) ферментов может осуществляться различными способами. Например, одно и то же вещество может быть общим субстратом для обоих ферментов или же конечный продукт, возникающий в результате действия одного фермента, может стать исходным субстратом действия другого фермента. Легко понять, что если работа одной из связанных вместе ферментных систем остановится, то остановится и другая. Причины такого нарушения деятельности ферментов могут быть различными. Например, взаимозависимость может обусловливаться и по линии субстратов (когда конечный продукт одной системы является начальным субстратом и для другой), и по линии обеспечения энергией обеих ферментных систем (первая система может доставлять энергию, необходимую для функционирования второй).

Чтобы иметь представление о согласованности действия ферментов, приведем следующий пример.

Ни одна живая клетка не в состоянии начать использование энергии глюкозы, не превратив ее в соединение с фосфорной кислотой (в глюкозофосфорную кислоту).

Образование глюкозофосфорного соединения может произойти двумя путями: 1) при наличии в клетке гликогена фермент фосфорилаза, при участии неорганической фосфорной кислоты, будет отщеплять глюкозу от гликогена прямо в форме глюкозофосфорной кислоты (глюкозо-1-фосфата). Глюкозо-1-фосфат, при участии фермента фосфоглюкомутазы, превратится в глюкозо-6-фосфат (этот фермент переносит фосфорную кислоту от первого атома углерода

глюкозы к шестому); 2) при отсутствии гликогена попавшая в клетку глюкоза при помощи фермента гексокиназы и энергии аденозинтрифосфорной кислоты превратится в глюкозо-6-фосфат.

Таким образом, для образования глюкозо-6-фосфата в первом случае энергия была взята из гликогена, а во втором потребовалась энергия от особого энергетического вещества — аденозинтрифосфата. При этом аденозинтрифосфат перешел в аденозиндифосфат, потеряв одну молекулу фосфорной кислоты.

Далее, глюкозо-6-фосфат, под действием фермента оксоизомеразы, превращается в фруктозо-6-фосфат. Из фруктозо-6-фосфата, при участии фермента фосфогексокиназы и аденозинтрифосфорной кислоты, образуется фруктозо-1,6-дифосфат, при этом аденозинтрифосфат переходит в аденозиндифосфат.

Фруктозо-1,6-дифосфат, под действием фермента альдолазы, распадается на глицеральдегид-3-фосфат и диоксиацетонфосфат. Последнее вещество, под действием фермента изомеразы, превращается также в глицеральдегид-3-фосфат. Глицеральдегид-3-фосфат реагирует с неорганическим фосфором и образуется глицеральдегиддифосфат.

На последнее вещество действует дегидраза при участии кофермента кодегидразы 1 и образуется продукт окисления глицеринового альдегида — 3-фосфоглицероилфосфат. Последний реагирует с аденозиндифосфорной кислотой при участии фермента фосфоферазы, причем образуются аденозинтрифосфорная кислота и 3-фосфоглицериновая кислота.

На этом этапе на 3-фосфоглицериновую кислоту действует фермент мутаза, который перемещает фосфорную кислоту из положения третьего в положение второе, образуется 2-фосфоглицериновая кислота. Только на 2-фосфоглицериновую кислоту может действовать фермент енолаза. Этот фермент отнимает молекулу воды и превращает 2-фосфоглицериновую кислоту в 2-фосфопировиноградную кислоту. На последнюю действует фермент фосфофераза, который переносит фосфорную кислоту на аденозинфосфат, образуются аденозинтрифосфат и пировиноградная кислота.

Пировиноградная кислота у молочнокислых бактерий, при участии специальной дегидразы (лактикодегидразы) и восстановленного кофермента — кодегидразы 1, превращается в молочную кислоту.

У дрожжей же пировиноградная кислота, под действием тиаминовой декарбоксилазы, превращается в углекислый газ (CO_2) и уксусный альдегид. Последний же, при участии фермента дегидразы и восстановленной кодегидразы 1, превращается в винный спирт.

Общий запас потенциальной химической энергии в одной грамм-молекуле (т. е. в 180 *г*) глюкозы составляет 686 000 калорий. Эта энергия может освободиться только при распаде глюкозы до CO_2 и H_2O.

При распаде глюкозы до стадии молочной кислоты освобождается лишь 36 000 калорий, при этом 20 000 калорий переносятся на фосфатную связь аденозинтрифосфорной кислоты.

При превращении глюкозы до CO_2 и винного спирта освобождается 50 000 калорий, причем 20 000 калорий сохраняется в образовавшейся аденозинтрифосфорной кислоте.

Таким образом, чтобы освободить менее 10% химической энергии глюкозы, потребовался указанный сложный путь ступенчатого превращения, в котором последовательно приняли участие 12—13 различных специфических белков-ферментов, неорганическая фосфорная кислота, аденозиндифосфат и аденозинтрифосфат, ионы магния, кодегидразы (а в случае спиртового брожения и тиаминовая декарбоксилаза). При этом указанный ступенчатый путь превращений глюкозы привел к накоплению химической энергии в форме аденозинтрифосфорной кислоты. Последняя же является важнейшим фосфорным органическим соединением, способным поставлять энергию для сокращения мышечного волокна или другого физиологического процесса.

В клетках тела животного глюкоза сначала превращается тем же путем в пировиноградную кислоту, а дальше пировиноградная кислота проходит сложный ферментативный путь распада до CO_2 и H_2O. На этом последнем пути распада принимают участие различные дегидразы с кодегидразой 1 и кодегидразой 2, фермент с тиаминовым коферментом, фермент с коферментом А (пантотеновая кислота), фермент с биотиновым коферментом, флавиновые ферменты и вся система цитохромов и цитохромоксидазы.

Таким образом, использование энергии глюкозы происходит по одному и тому же способу у представителей самых отдаленных ветвей жизни, что опять-таки подтверждает процессы эволюции и единство всего живого на Земле.

Вместе с тем, наряду с общими закономерностями распада сахара, у каждого вида могут быть свои дополнительные ферментативные механизмы превращений веществ. Так, в теле животного в дальнейшем распаде пировиноградной кислоты принимает участие большое количество других специфических белков-ферментов.

Распад других органических веществ (различных аминокислот, жирных кислот, витаминов, гормонов) происходит при участии многих дополнительных специфических белков и коферментов. Только в тех звеньях обмена, где имеются тождественные с углеводным обменом промежуточные продукты, встречаются ферменты распада сахара.

Изучение согласованности действия ферментов в живом организме представляет интерес не только для биохимиков, но и для врачей, технологов и других специалистов.

Еще два века назад гений М. В. Ломоносова предвидел, что «медик без довольного познания химии совершен быть не может». Эти слова — пример замечательного научного предвидения. Они оправданы всем ходом развития биохимии и постоянно подтверждаются новейшими открытиями в области ферментов. Еще не так давно о соляной кислоте знали, что она необходима как активатор фермента желудочного сока — пепсина. Оказалось, что поступление

соляной кислоты в желудочный сок обеспечивается действием специального фермента, способствующего ее выработке.

Все мы знакомы с той ролью, которую в нашем организме играет красящее вещество крови — гемоглобин. Эта роль заключается в связывании кислорода воздуха и доставке его в ткани тела. Механизм связывания кислорода гемоглобином был так хорошо изучен, что никто не сомневался в зависимости этого процесса от давления кислорода во вдыхаемом воздухе; законы физики, вернее, физической химии, казалось бы, объяснили этот процесс полностью. Но несколько лет назад и для этого процесса был обнаружен в крови специальный фермент — глобиноксидаза.

Таким же физико-химическим процессом до недавнего времени считали освобождение углекислого газа из солей угольной кислоты (бикарбонатов) в крови. Оказалось, что и этот простой химический процесс катализируется особым ферментом — угольной ангидразой (карбоангидразой), ферментом, в составе которого был обнаружен цинк.

Нет сомнений, что ближайшие годы принесут нам новые доказательства повсеместности ферментов в нашем теле и их участия во всех химических превращениях в его жидкостях и тканях.

Ни одно заболевание не проходит без нарушений в химических процессах обмена веществ и, следовательно, без нарушений в деятельности ферментов, которая в живых клетках здорового организма отличается глубокой взаимностью и удивительной согласованностью. Естественно, что возникла мысль: нельзя ли использовать ускорители химических реакций — ферменты — для лечения больных? Особенно широкое распространение получило лечебное применение ферментов, содержащихся в пищеварительных соках: пепсина, трипсина, химотрипсина. С лечебной целью применяются и препараты многих других ферментов. Так, гиалуронидаза — фермент, разрушающий межклеточное вещество,— используется для ускорения всасывания лекарственных веществ, вводимых под кожу или внутримышечно. Грозное для организма заболевание — тромбоз (тромб — сгусток крови, образующийся прижизненно в кровеносных сосудах и могущий вызвать его закупорку) — лечат при помощи плазмина. Этот фермент, образующийся из неактивного профермента плазминогена, обладает способностью как бы растворять (лизировать) тромбы. Препараты дыхательных ферментов применяют, когда организму грозит кислородное голодание, и т. д.

С лечебной целью применяются не только ферменты-белки, но и те небелковые соединения (коферменты), которые входят в состав различных ферментативных систем. В состав таких коферментов входят многие (а возможно, и все) из хорошо известных витаминов — органических соединений, недостаточность или отсутствие которых в пище вызывает нарушение нормального обмена веществ и заболевание организма. Лечить такие заболевания, казалось бы, просто — следует устранить недостаточность витамина (или витаминов) повышенной дачей их больному. Однако, когда витамин

входит в состав кофермента — небелковой части фермента, этого недостаточно: если белковая часть фермента разрушена, то введение в организм самых больших количеств кофермента (витамина) все равно не дает желаемого эффекта. Следовательно, в первую очередь надо устранить белковое голодание, способствовать нормализации процессов создания необходимых организму белков, заботиться о соответствующем белковом составе пищи.

Коферменты широко используются с лечебной целью, особенно когда их недостаточность вызывает нарушение обмена веществ вследствие расстройства деятельности соответствующих ферментов. Достаточно упомянуть о таких коферментах, как содержащие витамин B_1, тесно связанный с ферментативными превращениями углеводов, витамин B_2 (рибофлавин) — кофермент ферментов окисления или никотиновую кислоту — кофермент дыхания тканей и др. Эти и другие коферменты прочно вошли в арсенал лечебных средств современной медицины в первую очередь потому, что призваны действовать не на симптомы (признаки) болезни, а на самые интимные и действительные ее причины — нарушения в обмене веществ.

Ферменты как химические реактивы

За последнее время ферменты нашли в исследовательских лабораториях еще одно применение — в качестве химических реактивов. По сравнению с большинством обычно применяемых химических реактивов ферменты отличаются уже упоминавшимися нами очень ценными качествами: высокой специфичностью и большой чувствительностью.

Хотя, как отмечалось выше, не все ферменты строго специфичны, но все же специфичность действия остается наиболее ярко выраженным и весьма характерным их свойством.

Современную медицину интересует другой вид специфичности ферментов, а именно специфичность ферментов различных органов (печени, сердца и др.). Определяя активность того или иного фермента в сыворотке крови, важно установить, какой именно орган является его источником. В этом отношении большую роль играют так называемые изоферменты. Как известно, молекула ряда ферментов состоит из белковой (апофермент) и небелковой (кофермент) части. В третичной структуре белковой части одного и того же фермента можно наблюдать различия, устанавливаемые различными методами, в первую очередь электрофоретическими.

Таким образом, фермент удается фракционировать на несколько изоферментов (например, для лактатдегидрогеназы удалось электрофоретически установить пять изоферментов). Между отдельными изоферментами одного и того же фермента нет различий в специфичности действия. Но содержание различных изоферментов в различных органах (печень, сердце и т. д.) различно, и это помогает, определяя активность данного изофермента в сыворотке крови, в

известной степени судить о его происхождении. Другими словами, «органоспецифичность» изоферментов какого-либо фермента выражена больше, чем «органоспецифичность» того же фермента, взятого в целом.

Высокая специфичность действия ферментов позволяет определить целый ряд искомых веществ в сложных смесях без предварительного отделения их от сопутствующих веществ, мешающих исследованию. Таким образом, сберегается много времени и труда, обычно затрачиваемых на предварительную очистку искомого вещества. В настоящее время разработаны сотни ферментных методов анализа и их модификаций. В дальнейшем изложении описанию этих методов будет уделено особое внимание.

Ферменты можно использовать и для предварительной подготовки материала к анализу.

Очень важно знать содержание витаминов в том или ином пищевом продукте. Однако непосредственный химический анализ не всегда ведет здесь к цели. Многие витамины содержатся в биологическом материале в связанном виде. Эту связь можно разорвать, обрабатывая исследуемую пробу соответствующим ферментом. Благодаря такой обработке витамины высвобождаются из связанного состояния и делаются доступными для обнаружения обычным химическим анализом.

Нередко в химическом анализе ферменты применяются как своеобразные индикаторы для обнаружения того или иного вещества или для определения конца реакции.

Чтобы знать сущность процессов обмена веществ здорового организма, необходимо изучить, как ведут себя при этом ферменты. Тогда можно судить и о том, как изменяются ферменты при тех нарушениях химических превращений, которые характерны для больного организма.

Когда нас интересует, например, роль сахара в организме, мы при помощи специальных химических реактивов открываем сначала присутствие сахара, скажем, в моче, а затем уже ведем количественный учет этого сахара. Можно ли поступить так же и в отношении ферментов?

В принципе можно; только присутствие ферментов обычно открывают не при помощи реактивов, непосредственно вступающих с ними в какую-либо, например цветную, реакцию, а по наиболее характерному признаку фермента — его специфическому действию.

В секретах и биологических жидкостях ферменты находятся в растворенном состоянии. Чтобы открыть тот или иной фермент в таком биологическом материале, надо помнить основные особенности ферментов (термолабильность, зависимость от pH, специфичность и высокую эффективность действия). К небольшому объему биологического материала в пробирке или колбочке прибавляют такой солевой раствор, чтобы он мог обеспечить постоянную и оптимальную реакцию среды для искомого нами фермента, затем прибавляют соответствующий субстрат, ставят в термостат при 37° и наблюдают

за его действием. Если субстрат начнет исчезать с заметной скоростью, то это означает, что в биологической жидкости имеется определенный фермент. Чтобы окончательно убедиться, что действие (исчезновение субстрата) вызвано ферментом, а не простым катализатором, с другой порцией той же биологической жидкости проделывают следующее: сначала ее нагревают до кипения, а затем, охладив до 37°, прибавляют субстрат и следят за результатом (параллельно с наблюдением за первой пробой).

Если в кипяченой жидкости субстрат не исчезает, значит исчезновение субстрата в первой порции произошло только благодаря ферменту.

Можно открывать фермент не по исчезновению субстрата, а по появлению продукта распада субстрата. Так, амилаза открывается не только по исчезновению крахмала, но и по появлению продуктов его распада — сахара (последний легко обнаружить химической реакцией).

Открытие ферментов, находящихся в клетках и не выделяемых клеткой в тканевую жидкость, и их выделение производится чаще всего путем размельчения клеток и экстрагирования их растворителем (водой, растворами солей и др.). В экстракт вместе с ферментами переходят и сопутствующие вещества (белковые и небелковые), что нередко мешает выявлению в экстракте того или иного фермента, так как существуют вещества, тормозящие действие ферментов и даже специфических антиферментов.

Для каждого фермента разработаны специфические методы определения его активности, и относительное содержание каждого фермента выражают в так называемых условных единицах его активности.

В настоящее время разработаны и такие методы, которые позволяют учитывать непосредственно (не по активности) количество того или иного фермента в исследуемой жидкости. Но они пока малодоступны.

Из сказанного следует, что условные единицы ферментативной активности различны не только для каждого отдельного фермента, но могут быть различными и при оценке активности одного и того же фермента.

Так, например, методы определения амилазной активности крови, основанные на учете количества образовавшегося сахара, отличаются от методов, в которых амилолитическая активность крови определяется по способности разрушать гликоген. В первой категории методов результат в значительной степени определяется способностью крови разлагать образующиеся низшие полисахариды, т. е. декстрины, до гексоз, что можно в известной степени сравнить с альфа-амилазной активностью, в то время как оценка ферментативной активности по разложению гликогена (нефелометрический метод) ближе к определению так называемой бета-амилазной активности. В последнем случае речь идет только о разрушении крупных молекул полисахарида до декстринов, дальнейший же процесс этим

методом не учитывается. Аналогичные в принципе результаты дают методы, основанные на определении момента исчезновения йодкрахмальной реакции.

Какова сравнительная ценность с клинической точки зрения определения отдельных фаз амилолитического процесса, неизвестно, так как систематического сравнения на большом материале не производилось. Не исключена возможность, что исследование расхождения между результатами различных методов оценки амилолитической способности крови представляет интерес.

Другой пример. Фермент пероксидаза обладает способностью окислять большое количество субстратов и использовать для этого окисления не только кислород перекиси водорода, но и кислород других перекисей. Благодаря этому можно предложить большое количество методов учета активности фермента, основанных на использовании различных реакций. Но будут ли эти методы равноценными? Если бы речь шла не об определении ферментативной активности крови, а об активности какого-нибудь высокоочищенного кристаллического фермента, можно было бы предположить, что эти методы взаимозаменяемы, так как чистое вещество имеет определенные константы и достаточно для проверки определить одну или несколько констант, чтобы знать остальные. Но когда идет речь о ферментативной активности крови, это рассуждение неприменимо, так как на содержащийся в крови фермент влияют многочисленные активаторы и ингибиторы, которые при различных субстратах действуют по-разному.

Если, например, меняется способность крови окислять бензидин, это еще не означает, что таким же образом изменяется ее способность окислять пирогаллол. Несомненно, что параллельное определение пероксидазы при помощи разных методов представляет интерес при патологических процессах, но в этом отношении наблюдений с пероксидазой нет.

Как для определения активности ферментов, так и для использования ферментов в качестве химических реактивов для аналитических целей применяются самые разнообразные методы, среди которых наибольшее распространение получили колориметрические, фотометрические, спектрофотометрические, флуориметрические и манометрические. Общее описание этих методов дано в специальных руководствах [1]. Что касается специального применения их в ферментном анализе, то детальное описание каждого метода приводится в дальнейшем изложении.

Мы уже упоминали, что методы оценки ферментативной активности довольно различны. Можно ли говорить о биохимических нормативах для ферментов? Этот вопрос вполне обоснован, поскольку, даже при определении одним и тем же методом, величины

---

[1] См., например: В. С. Асатиани. Биохимическая фотометрия. М., Изд-во АН СССР, 1957; его же. Методы биохимических исследований. М., Медгиз, 1956; его же. Новые методы биохимической фотометрии. М., «Наука», 1965.

выраженные в условных единицах какого-либо фермента, нередко колеблются в широких пределах, причем различия между минимальными и максимальными цифрами могут достигать нескольких сот процентов!

В этом отношении колебания показателей ферментативной активности заметно отличаются, например, от таких показателей, как содержание сахара в крови, в норме колеблющихся в сравнительно узких пределах от 70 до 100 *мг%*.

И все же биохимические нормативы представляют интерес и в отношении ферментов, так как исходные цифры, характеризующие активность ферментов в здоровом организме, нужны и здесь. Такие нормы, условные в широком смысле этого слова, позволяют судить прежде всего о том, что является нарушением обычного уровня активности ферментов. Подавляющее большинство химических реакций обмена веществ в организме протекает при непременном участии ферментов. А так как почти все заболевания человека вызываются или сопровождаются нарушением обмена веществ или являются следствием его, то ясно, что изменение активности того или иного фермента может позволить судить о характере заболевания, помочь установить наличие заболевания, предсказать его исход, может служить подсобным критерием для оценки эффективности того или иного вида лечения.

Но установление норм ферментативной активности необходимо не только врачу.

Несмотря на большое сходство закономерностей обмена веществ во всех живых организмах, особенно в организме человека и животных, в процессе развития живых существ под влиянием изменения условий их существования сложились такие особенности химических превращений, которые типичны для каждого вида живых существ. Изучение и сравнение норм ферментативной активности у одного и того же вида на различных стадиях индивидуального развития организма, начиная с внутриутробной жизни и кончая глубокой старостью, и у различных видов живых существ имеет большое теоретическое и практическое значение для биохимии развития, возрастной биохимии, сравнительной биохимии. Знание этих норм необходимо и для решения важнейшей проблемы биологии — создания искусственного белка, наделенного всеми свойствами живого, вернее теми свойствами, которыми захочет наделить его человек.

Особенно богатый ассортимент ферментов изготовляет организм микробов. Микроорганизмы все шире используются для организации ферментных заводов, вырабатывающих препараты ферментов для нужд различных отраслей промышленности. Эти ферменты уже применяются для производства лечебных вакцин, для обработки шелковых и хлопчатобумажных тканей, обезжиривания шерсти, для переработки древесины с целью получения из нее технических и пищевых продуктов и т. д.

Препараты ферментов находят широкое применение и в тех отраслях пищевой промышленности, в которых свойства ферментов

2 В. С. Асатиани

используются с незапамятных времен,— производстве хлеба, пива, спирта, вина и др.

В данной главе затронуты в очень краткой и по возможности доступной форме наиболее существенные вопросы современной ферментологии. В одной книге невозможно исчерпывающе изложить новейшие данные о ферментных методах. В последующих главах основное внимание будет уделено свойствам отдельных ферментов, способам определения их активности и методам применения ферментов как химических реактивов для целей количественного биохимического анализа.

Как образуются ферменты в живой клетке? Синтез фермента — это синтез белка, а белки, как известно, синтезируются при обязательном участии двух кислот — ДНК (дезоксирибонуклеиновой) и РНК (рибонуклеиновой).

Если под влиянием определенного химического соединения клетка начинает синтезировать какой-либо фермент, который до этого не синтезировала, то это явление называют индукцией. В некоторых случаях, например у микроорганизмов, биосинтез ферментов может быть индуцирован отсутствием в питательной среде продуктов, необходимых организму, при одновременном наличии в среде веществ, которые в результате ферментативных процессов (например, расщепления) могут быть превращены в указанные выше продукты. Возбудитель индукции обычно бывает субстратом данного фермента или сходным с ним веществом. А вот когда продукт ферментной реакции (или сходное с ним вещество) начинает подавлять синтез фермента, в этом случае мы имеем дело с репрессией. Подавитель синтеза — репрессор синтезируется под контролем специального «гена-оператора» (в отличие от «структурных» генов или цистронов, определяющих первичную структуру соответствующих ферментов). Этот репрессор (белковой природы) проявляет свое действие в блокировании передачи информации с ДНК на информационную РНК. Живая клетка располагает и «генами-операторами», которые ответственны за перенос информации сразу от нескольких структурных генов к нескольким белкам. Репрессор может подавить работу оператора и прекратить, таким образом, синтез белков. А вот индуктор может так воздействовать на репрессор, что прекращает подавление оператора. Взаимодействие репрессора с оператором зависит от внутриклеточной (и внеклеточной) концентрации субстратов и метаболитов, которые, влияя таким образом на синтез ферментов, фактически регулируют собственные превращения в процессе обмена веществ в клетке. Таковы, в самых общих чертах, представления об образовании ферментов в живой клетке. Что касается деятельности ферментов в живых клетках, то здесь большую роль играют распределение ферментов и функциональное значение этого распределения.

Число ферментов, содержащихся в любой живой клетке, очень велико (часто достигает 1000). Как было указано выше, каждый фермент проявляет свою активность специфически, катализируя

лишь одну или небольшое число реакций. Этот катализ осуществляется в определенной последовательности определенными ансамблями ферментов. Для упорядоченного действия ферментов большое значение имеет распределение ферментов между структурными элементами клетки — ядром, митохондриями, микросомами, внутриклеточной жидкостью.

Ниже мы излагаем действие ферментов в живой клетке, как его представляют себе Хесс и Бранд [11].

По современным взглядам, ферменты локализуются в двух главных, пространственно разграниченных областях клетки, а именно: в митохондриальных структурах и цитоплазме. Распределение митохондриальных ферментов изучалось на многих тканях. Эти исследования проводились, исходя из того основного положения, что перенос электронов по дыхательной цепи осуществляется благодаря целостности указанной системы, в которой как последовательность молекулярных ансамблей, так и их количество постоянны. Отсюда следует, что как абсолютные, так и относительные количества ферментов, осуществляющих определенную биохимическую функцию, для данной ткани должны быть постоянными.

Имеется экспериментальный материал, иллюстрирующий существование этого постоянства количественного соотношения различных дыхательных ферментов в отдельных тканях. Относя количество того или иного фермента к количеству цитохрома *a*, взятого в качестве эталона (что оправдано его весьма малой растворимостью и особыми спектральными свойствами), легко убедиться в том, что в столь различных тканях, как скелетные мышцы холоднокровных, сердце и мышцы теплокровных, а также в дрожжах, отношения молярных концентраций пиридиновых, флавиновых ферментов и цитохромов дают близко совпадающие значения. Аналогичные данные имеются и в отношении различных дегидрогеназ, связанных с митохондриями, а также оксидаз и трансаминаз. Оказалось, что и в этом случае отношение активности ферментов к цитохрому *a* в различных тканях характеризуется постоянством. Таким образом, для цепи передачи электронов, состоящей из набора митохондриальных ферментов, характерным является сохранение постоянства их относительных количеств, выраженных в молярных долях или активностях, независимо от ткани, в которой они содержатся. В аналогичную схему укладываются дегидрогеназы яблочной и янтарной кислот, глутамат-оксалоацетаттрансаминаза, оксидаза пировиноградной кислоты различных тканей: мозга, скелетных мышц, печени и сердца крысы и летательных мышц саранчи. Наряду с этими ферментами существуют и такие, которые отклоняются от указанной закономерности и относительное количество (активность) которых в значительной мере варьирует от ткани к ткани, что, очевидно, связано со спецификой отдельных тканей или зависит от общего типа обмена веществ.

Что касается абсолютного количества ферментов, то, принимая цитохром *a* за единицу, можно обнаружить колебания в содержании

митохондриальных ферментов в различных тканях в широких пределах — от 7000 до 17 000 на одну митохондрию. Очевидно, определяющим фактором в этом случае является функциональная специфичность митохондриальной структуры данной ткани. Так, например, митохондрии летательных мышц саранчи относятся к типу наиболее крупных и сложно устроенных, в то время как митохондрии клеток печени или асцитных клеток являются представителями наиболее простого типа; активность ферментов в последних намного ниже по сравнению с активностью той же группы ферментов митохондрий летательного аппарата саранчи.

Распределение цитоплазматических ферментов, в основном ферментов гликолиза и трансаминаз, также следует закону постоянства относительных концентраций. В отношении ферментов цитоплазмы ферельтом-эталоном служит дегидрогеназа фосфоглицеринового альдегида. Сравнивая относитеыьеые концентрации ряда гликолитических ферментов, рассичитанненуказанным методом, удалось установить постоянство активности группы ферментов, находимых как в мышцах крупного скота, так и в летательных мышцах насекомых. Абсолютныке количества тех жеферментов в пересчете на 1 *г* веса ткани в 5 раз отличаются друг о друга. Вместе с тем и среди цитоплазматических ферментов иметются такие, количество которых варьирует независимо от относительных концентраций прочих ферментов, относящихся к той же группе; к этим ферментам относятся, в частности, дегидрогеназа 1-фосфоглицерина и лактикодегидрогеназа.

Сказанное позволяет заключить, что уровень относительной концентрации ферментов может быть установлен достаточно простым путем, посредством определения активности «ключевого» фермента, служащего эталоном для данной группы. Принцип постоянства относительных концентраций ферментов, по-видимому, должен облегчить задачу составления «ферментных карт», характеризующих как нормальное, так и патологическое состояние ткани. Активность и молярная концентрация ферментов, не следующих указанному принципу, должны быть определены независимо. В дальнейшем наши сведения, касающиеся относительной активности ферментов, должны быть пополнены путем изучения, под данным углом зрения, ряда других ферментных систем.

Приведенная картина свидетельствует о существовании определенной координации в распределении клеточных ферментов, осуществляемой на молекулярном уровне. Однако на клеточном уровне подобная закономерность выявлена лишь с качественной стороны. Локализация гликолитических и дыхательных ферментов была изучена главным образом посредством дифференциального центрифугирования тканевых гомогенатов; на основании этих исследований установлен факт «компартементализации»[1] ферментных наборов в цитоплазматической и митохондриальной фазах клетки. Вместе с

---

[1] Размещения в отдельных пространствах.

тем, изучение вопроса на количественном уровне пока еще остается целью дальнейших работ.

Усилия исследователей должны быть направлены на вскрытие общего механизма регуляции концентрации ферментов и их пространственного распределения. По-видимому, следует ожидать обнаружения не единого, а двух различных механизмов; одного — управляющего регуляцией ферментов, сохраняющих свою постоянную групповую относительную концентрацию, и второго механизма, управляющего регуляцией тех ферментов, количество которых изменяется независимо от первых. При этих исследованиях в первую очередь должно быть принято во внимание явление индукции и репрессии ферментов, устанавливающее связь между генотипом клетки и регулируемым синтезом ферментов. Регуляция концентрации ферментов должна быть строго разграничена от регуляции активности ферментов, осуществляющейся в совершенно различных масштабах времени; если первая, связанная с деятельностью систем синтеза, требует длительного латентного периода, измеряемого часами, то вторая осуществляется в течение секунд. В качестве примера можно привести известный факт влияния гормона щитовидной железы на активность митохондриальной оксидазы α-глицерофосфата или влияния инсулина на активность фосфоэнолпируваткарбоксилкиназы.

Удельный вес различных видов регуляции, концентрации ферментов являются одной из малоизученных, но весьма захватывающих проблем биологии и патологии млекопитающих.

Стационарное состояние и тип метаболизма клетки

Рассматривая распределение ферментов в живой клетке как некоторое постоянное для данного отрезка времени (обновлением белков-ферментов можно в известной степени пренебречь), мы можем сосредоточить внимание на регуляционных характеристиках ферментных систем, пользуясь при этом терминами кинетики стационарного состояния и метаболических типов. Располагая соответствующими данными для определенной группы ферментов, можно распознать целый ряд стационарных и переходных состояний.

Поскольку группа, состоящая из ряда взаимосвязанных ферментов, активируется при доставке субстрата извне или при его образовании внутри системы, концентрации ферментов должны повышаться и сохранять повышенный уровень активности в течение всего того времени, пока не прекратится снабжение системы субстратом; в течение этого времени через данную ферментную систему будет проходить один из основных метаболических потоков. Каждый фермент, входящий в систему, будет связываться с соответствующим субстратом по мере возникновения последнего в результате деятельности предыдущих ферментативных звеньев. Вследствие этого общая скорость обмена будет, в конечном итоге, зависеть от скорости

образования первичного субстрата. Подобное состояние метаболизма может быть названо «индуцированным стационарным состоянием», его можно охарактеризовать величиной скорости доставки субстрата, общей скоростью метаболического потока и определенным уровнем концентрации всех промежуточных продуктов.

Графически регуляционную характеристику подобной ферментной системы можно представить в виде кривых зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата, пересекаемых прямой, проведенной на уровне плато, образованного графиком наиболее медленно протекающей ферментативной реакции. Эту пересекающую прямую называют линией метаболической нагрузки. Описанный способ позволяет также определить уровень «загрузки» фермента соответствующим субстратом. При изменении одного из параметров системы и достижении стационарного состояния на новом уровне смещается линия метаболической нагрузки, выражая собой то новое состояние, в которое перешла ферментная система в целом. В физиологических условиях число различных стационарных состояний, очевидно, ограничивается двумя основными уровнями, которые наиболее просто можно определить как «нулевое состояние», в котором метаболический поток, проходящий через данную ферментную систему, носит следовый характер и состояние максимальной нагрузки, наивысшей активации системы. Представляло бы огромный интерес сопоставление интенсивности метаболического потока в патологических условиях с этими двумя основными состояниями.

Переход от одного стационарного состояния в другое связан с замедлением или ускорением метаболического потока или же со сменой самого характера обменных процессов. Вопрос, касающийся переходных состояний, достаточно сложен и требует отдельного рассмотрения; следует только отметить, что изучение переходных состояний дает весьма ценную информацию относительно отдельных ферментных систем, претерпевающих значительные изменения в широком интервале концентраций (от максимальных к минимальным или обратно) и скорости метаболического потока, ускоряющегося или замедляющегося, что позволяет определить характер регуляции обмена веществ, относя его к физиологическому или патологическому типу.

Оказалось возможным выявить ряд стационарных состояний, достигаемых системой на различных уровнях, в зависимости от условий снабжения кислородом, доставки субстрата, синтеза АТФ и АДФ и накопления неорганического фосфата, необходимого для окислительного фосфорилирования. Уровень, на котором устанавливается стационарное состояние, в данном случае может быть выражен через скорость потребления кислорода и синтеза АТФ или в виде процентного содержания восстановленной формы компонентов дыхательной системы. Функционально в данном случае можно различить два состояния. При одном из них отмечен избыток АДФ или неорганического фосфора, а также кислорода и субстратов, что обес-

печивает быстрый перенос электронов и связанный с ним высокий уровень равновесия между окисленной и восстановленной формой дыхательных коферментов и интенсивное потребление кислорода. В другом состоянии система пребывает в покое, уровень метаболизма близок к статическому равновесию, содержание в ней АДФ и неорганического фосфора низкое, АТФ находится в избытке, что обусловливает прохождение минимального потока электронов по дыхательной цепи с незначительным потреблением кислорода.

Регуляторная роль концентрации АДФ и неорганического фосфата в отношении скорости потребления кислорода, хорошо известная в физиологии клетки, распространяется на всю дыхательную систему. Таким образом, данная система, построенная по принципу сохранения постоя нства относительных концентраций компонентов, в функциональном отношении может быть рассмотрена как единая группа ферментов.

Приложение описанного метода к изучению метаболизма митохондрий в интактных клетках позволяет посредством измерения величины тех же параметров охарактеризовать состояние живой системы. Так, например, установив различие двух основных состояний одног из переносчиков кислорода, цитохрома „b", можно сделать определенные заключения относительно нахождения всей системы на одномизметаболических уровней. В первом случае происходит образование АДФ внутри системы и связанное с ним фосфорилирование глюкозыопри участии гексокиназы, при этом наблюдается высокая интенсивность потребления кислорода. Во втором случае система находится на значительно более низком метаболическом уровне, потребление кислорода относительно невелико, лимитирующим фактором является низкая концентрация АДФ. Следовательно, состояние цитохрома „b" и скорость потребления кислорода дают полную информацию относительно уровня окислительного фосфорилирования, осуществляемого данной системой в определенных условиях.

В условиях патологии процентное содержание восстановленной формы компонентов дыхательной цепи и скорость потребления кислорода системой будет зависеть от локализации патологического фактора, нарушающего деятельность определенного звена дыхательной цепи. Прекращение доставки субстрата приведет к полному окислению соответствующего компонента системы, недостаток снабжения кислородом — к его полному восстановлению. Так, хорошо известно явление разобщения окислительного фосфорилирования при чрезмерно высокой скорости окисления; при этом переносчики кислорода находятся в окисленном состоянии, снабжение системы субстратом приобретает значение лимитирующего фактора; подобное состояние наблюдается при тиреотоксикозе. Известно также патологическое воздействие стероидов на обмен митохондрий; можно упомянуть и известный факт нарушения окислительного фосфорилирования при патологическом состоянии — саркомах скелетной мускулатуры.

Более детально изучены условия стационарного состояния цитоплазматической ферментной системы гликолиза. В данном случае, в противоположность окислительному фосфорилированию, механизм каждой ферментативной реакции, участвующей в указанном биохимическом процессе, известен значительно полнее, что позволяет на основании сопоставления состояния ферментов *in vitro* и *in vivo* сделать определенные выводы относительно регуляционных характеристик живой системы. И в этом случае состояние системы можно охарактеризовать на основании знания концентраций метаболитов и скорости метаболического потока. Рассмотрим с этой точки зрения два различных состояния гликолиза. Одно из этих состояний, называемое эндогенным, изучено на клетках асцитной опухоли Эрлиха, имплантированных в брюшную полость мыши; оно определяется на основании прямых данных, свидетельствующих о постоянном уровне гликолитических ферментов. Второе состояние изучалось на суспензии тех же клеток *in vitro* при добавлении глюкозы в концентрации 0,01 *M*. Наблюдения показывают, что в эндогенном состоянии уровень гексозофосфатных эфиров необычайно низок, так же как и содержание C_3-метаболитов. По-видимому, это объясняется низким содержанием глюкозы в брюшной полости мыши, достигающим всего 10^{-6} — 10^{-5} *M*, что явно недостаточно для активирования системы и не приводит к значительной интенсификации процесса. Потребление глюкозы и образование молочной кислоты в этих условиях близко к нулю. При добавлении глюкозы к изолированным клеткам асцитной опухоли Эрлиха происходит максимальная активация всей гликолитической системы; в соответствующих экспериментальных условиях можно наблюдать выработку молочной кислоты с постоянной скоростью, интенсивное потребление глюкозы и высокий уровень метаболитов в течение всего времени наблюдения (5 минут).

При добавлении глюкозы фонд гексозофосфорных эфиров увеличивается в 15—20 раз, следовательно, система доходит до насыщения. Вместе с тем интересно, что количество C_3-соединений повышается ненамного. Таким образом, при эндогенном состоянии гликолиза происходит образование ощутимых количеств малата, лактата и глицеро-1-фосфата, что, очевидно, обеспечивается функционированием некоторого канала, связывающего данный метаболический путь с обменом аминокислот, с пентозо-фосфатным путем обмена углеводов или с циклом трикарбоновых кислот, за счет чего и обеспечивается доставка необходимых субстратов. Грубый подсчет показывает, что уровень, на котором устанавливается стационарное состояние обмена упомянутых метаболитов, находится в диапазоне концентраций 10^{-3} — 10^{-5} *M*, что соответствует порядку констант Михаэлиса ферментов, участвующих в данном биохимическом превращении.

Регуляция каждого звена гликолиза может быть понята только в том случае, если удается установить количественное соотношение компонентов, выражающееся законом действия масс, что позволяет

вычислить коэффициент, определяющий уровень, на котором установилось стационарное состояние системы; следовательно, были достигнуты некоторые равновесные концентрации отдельных метаболитов гликолитических реакций. Равновесные концентрации метаболитов столь же характерны для гликолитического процесса, как отношения окислительно-восстановительных (редокс) потенциалов переносчиков кислорода, определяющие их последовательность в системе окислительного фосфорилирования. Эти соотношения, как и количества метаболитов, изменяются в зависимости от тех внешних, внутренних или же патологических изменений, которыми в конечном итоге определяется направление и интенсивность метаболического потока, проходящего по данному пути.

Численные значения соотношений могут быть установлены на основании сопоставления величин, получаемых, исходя из закона действия масс с термодинамическими константами равновесия (кажущимися константами равновесия), известными для данной гликолитической реакции. Из указанного сопоставления следует, что в стационарном состоянии гликолиза, в фазе максимальной активности, многие реакции находятся в квазиравновесном состоянии, в котором отношения действующих масс близки к кажущимся константам равновесия; ряд других реакций не проявляет подобной тенденции. К первому типу относятся реакции, катализируемые следующими ферментами: фосфорилазой, фосфоглюкомутазой, фосфогексоизомеразой, альдолазой, изомеразой триозофосфатов, фосфоглицератмутазой, енолазой и аденилаткиназой; на основании многих соображений к этой же группе ферментов следует отнести дегидрогеназу 3-фосфоглицеринового альдегида, лактатдегидрогеназу и дегидрогеназу глутаминовой кислоты.

В противоположность этому реакции, катализируемые фосфофруктокиназой и фосфоглицераткиназой, далеки от указанного выше равновесного состояния. В присутствии большого количества глюкозы так же ведет себя и гексокиназная реакция.

Отклонение от равновесного состояния может быть объяснено следующим. Если отклонение от кажущейся константы равновесия невелико, то, очевидно, фермент все еще сохраняет способность удерживать уровень, заданный скоростью снабжения субстратом катализируемой им реакции, который вырабатывается на предыдущей ступени ферментативного процесса. В этом случае активность фермента должна быть достаточно высокой для того, чтобы не снизилась общая скорость гликолиза. В другом случае, при значительном отклонении реакции от равновесного состояния, можно допустить, что или активность фермента недостаточна в кинетическом смысле для поддержания скорости общего метаболического потока на должном уровне, или, в случае бимолекулярной реакции, лимитирующим является концентрация одного из компонентов, участвующих в реакции. Существует и третья возможность — определенная часть субстрата недоступна для ферментативного воздействия ввиду разобщенности фермента и субстрата — физиологической компар-

тементализации. В последнем случае, поскольку химическому анализу поддаются лишь макроскопические величины, и результаты относят к весу клетки, субцеллюлярные структуры остаются вне поля зрения. Кинетически подобные реакции неотличимы от конкурентных.

Очевидно, с точки зрения регуляции обмена, упомянутые две группы ферментативных реакций имеют различное значение. По-видимому, можно утверждать с достаточным основанием, что в первой группе реакций скорость обмена контролируется ферментом, а во второй группе она зависит от концентрации субстрата или же от присутствия аллостерических репрессоров и активаторов. К такому же заключению пришел Бюхер на основании изучения регуляторных механизмов обмена в мышцах саранчи.

Исходя из сказанного, гликолиз можно подразделить на три этапа, линии раздела между которыми намечены пересечением метаболических путей. Представив всю картину метаболизма в виде системы последовательных реакций и попытавшись идентифицировать точки пересечения метаболических путей, мы в значительной степени приблизимся к раскрытию механизма регуляции ферментативных процессов. Выше говорилось относительно того, что ряд различных ферментативных реакций можно объединить в одну группу; поскольку реакции, относящиеся к одной и той же группе, обратимы, повышение концентрации одного из компонентов вызывает немедленное изменение концентрации всех остальных членов данной группы. Таким образом, вся группа ферментов напоминает гидродинамическую модель. Промежуточные продукты, возникающие в одной из групп, играют роль буфера по отношению к клетке в те моменты, когда внезапно возникают значительные функциональные нагрузки, требующие соответственно быстрой ответной реакции со стороны клеточного метаболизма. Наряду с такими реакциями существуют и другие, лимитирующие то или иное направление обмена, это как бы воронки, суживающие русла метаболизма. Именно в таком смысле можно разграничить отдельные стороны гликолиза, считая их такими же «единицами обмена», как и окислительное фосфорилирование, принятое за подобную единицу.

С этой позиции легко понять, что дать определение тому или иному состоянию гликолитического процесса возможно лишь на основании знания отношения действующих масс компонентов равновесных реакций и располагая данными относительно скорости метаболического потока. Так, например, если соотношение количеств фосфогексоизомеразы и енолазы изменяется лишь в пределах ошибки метода определения, соотношение веществ, участвующих в фруктокиназной реакции, изменяется втрое по сравнению с исходной величиной. Определив отношение действующих масс для реакций, катализируемых фосфофруктокиназой, пируваткиназой и фосфоглицераткиназой, а также величину потребления глюкозы и образования молочной кислоты, можно полностью охарактеризовать состояние гликолитического процесса. Не останавливаясь подробно

на вопросе взаимосвязи между действующими массами и скоростью метаболического потока, с одной стороны, и общими кинетическими константами и временем релаксации стационарного состояния, отметим, что указанная взаимосвязь устанавливается посредством кинетических измерений и сопоставления полученных данных с результатами измерения активности ферментов, экстрагированных из той же ткани *in vitro*. Эти измерения были, например, проведены в отношении фосфоглицератмутазы и енолазы, и было установлено, что максимальная скорость реакции V_{max}, отношение активностей обоих ферментов, вычисленные на основании отношения их действующих масс, скорости потока и константы Михаэлиса, полностью совпадают с результатами определения активности этих ферментов после их экстракции из ткани. Максимальная активность енолазы оказалась равной 1,9 · 10^3 *мкмолей/час* на 1 *г* влажного веса ткани, а отношение активностей фосфоглицератмутазы и енолазы равным 10. Вычисленные величины совпали с результатами измерения, проведенного на изолированных ферментах.

Динамическое взаимодействие между различными группами ферментов, осуществляющими тот или иной сложный метаболический путь, требует участия переходных механизмов, сущность которых не может быть выяснена лишь на основании изучения условий стационарности процесса. Для этого требуется анализ переходных состояний, возникающих при повышении или понижении интенсивности метаболического пути относительно уровня других, связанных с ним путей метаболизма, длящихся до достижения системой нового стационарного состояния. Изучение переходных состояний в условиях патологии приобретает несравненно большее значение, чем изучение стационарно протекающих процессов, поскольку позволяет выявить несбалансированные, патологически измененные ферментативные превращения. Замечательные наблюдения над переходным состоянием были в недавнее время проведены Гошем и Эстбруком [см. 11]. Ими было найдено, что при переходе от аэробиоза к анаэробиозу в присутствии глюкозы активность пиридиннуклеотида изменилась не одномоментно, перейдя на уровень, соответствующий новому стационарному состоянию системы, а через ряд постепенно затухающих осцилляций. Химическим анализом удалось показать, что эти осцилляции были сопряжены с такими же колебаниями ряда промежуточных продуктов гликолиза. Из этого наблюдения следует, что нарушение какого-либо одного звена обмена может вызвать нарушение систем ряда метаболических путей.

Подводя итог, изложенное можно кратко сформулировать следующим образом.

1. Состояние ферментной системы в живой ткани можно определить путем измерения максимальной активности ферментов в тканевом экстракте или же посредством прямых спектроскопических определений активности дыхательных коферментов в тканях. Исследованием относительных активностей ферментов гликолиза и концентраций компонентов дыхательной цепи выявлена важная

закономерность, заключающаяся в постоянстве относительных концентраций среди компонентов в определенных ферментных ансамблях. Абсолютное количество ферментов данной группы варьирует от ткани к ткани. Количество фермента-эталона одной из групп позволяет охарактеризовать кинетическое состояние всей группы. Вместе с тем имеются такие ферменты, количество которых варьирует независимо от изменения количеств остальных компонентов данной системы. Их активность следует определять отдельно.

2. Определение количества митохондрий на уровне клеток по данным химического и спектроскопического анализов позволяет сделать заключение относительно пространственного соотношения различных фаз живой системы, изменяющихся в патологических условиях (что было установлено в отношении эритропоэтической системы).

3. Внутриклеточные функции ферментных ансамблей могут быть изучены путем определения скорости метаболического потока и уровня, на котором установилось стационарное состояние компонентов данной системы. Этим методом удалось распознать ряд стационарных состояний при окислительном фосфорилировании и в процессе гликолиза. Патологическое состояние внутриклеточного обмена может быть охарактеризовано некоторыми параметрами, величина которых сопоставляется с величинами этих же параметров в физиологических условиях. Такой подход открывает путь к изучению патологических сдвигов в деятельности ферментов и создает базу для выработки соответствующих диагностических тестов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Владимиров Г. Е.* и *Лызлова С. Н.* Энзимология. Изд-во ЛГУ, 1962.
1а. *Кретович В. Л.* Биохимия растений. М., 1963, стр. 254.
2. *Диксон М.* и *Уэбб Э.* Ферменты. Изд-во «Мир», 1966.
3. *Нортроп Д.* Кристаллические ферменты. М., 1950.
4. Ферменты. Основы молекулярной биологии. Под редакцией акад. Браунштейна. М., Изд-во «Наука», 1964.
5. Итоги науки. Номенклатура ферментов. ВИНИТИ. М., 1966.
6. *Волькенштейн М. В.* Молекулы и жизнь. М., Изд-во «Наука», 1965.
7. *Бресслер С. Е.* Введение в молекулярную биологию. М. — Л., изд-во «Наука», 1966.
8. *Энгельгардт В. А.* Успехи современной биологии, 1941, **14**, 177.
9. *Энгельгардт В. А.* Пути химии в познании явлений жизни. М., Изд-во «Наука», 1965.
10. *Яковлев В. А.* Кинетика ферментативного катализа. М., Изд-во «Наука». 1965.
11. *Hess B. a. Brand.* Clin Chem., 1965, **11**, 223.
12. *Букин В. Н.* Витамины. М., Пищепромиздат, 1940.
13. Номенклатура ферментов. ВИНИТИ. М., 1966.

АНОМАЛИИ В БИОСИНТЕЗЕ ФЕРМЕНТОВ

Обычно принимают, что в каждой хромосоме человека содержится 5000 и более молекул ДНК, что при 46 хромосомах в каждой клетке составит не менее 300 000 молекул ДНК. Если принять, что при воспроизводстве этого огромного числа гигантских молекул клетка под влиянием каких-либо причин допустит десяток ошибок (1 ошибка на 300 000 «штук» выпускаемой продукции), т. е. образуются молекулы ДНК, отличающиеся по какому-либо признаку или показателю от других, свойственных данной клетке ДНК, то это следует считать высокой точностью воспроизводства, так как нарушения в воспроизводстве ДНК (если они происходят в половых клетках) лежат в основе генетических мутаций. Система синтеза ДНК сравнительно прочно застрахована от такой изменчивости и довольно надежно обеспечивает сохранение и передачу из поколения в поколение наследственной информации. Синтез и обмен РНК раз в 100 активнее, чем обмен ДНК, и «ошибок» здесь может быть гораздо больше, но они очень редко «передаются по наследству». Нарушения в синтезе белков, происходящем на матрицах нуклеиновых кислот, конечно, отражают ошибки в синтезе последних и, кроме того, могут происходить и в силу различных посторонних причин. Именно при изучении такого рода отклонений, наследственно передаваемых изменений синтеза белков, и родилась та область патологии, которую можно назвать учением о молекулярных болезнях.

Истоки молекулярных болезней надо искать в химической основе явлений наследственности. Известно, что такой основой является ДНК и что наследственная (генетическая) информация зависит, в частности, от определенной специфической последовательности оснований в молекуле этой нуклеиновой кислоты.

Поскольку речь пойдет о наследственных болезнях, остановимся на некоторых, наиболее употребительных терминах, которыми пользуются в генетике [1, 2, 3, 3а]. В клетках (соматических) тела человека число хромосом в два раза больше, чем в зрелых половых клетках, так как половина хромосом происходит от матери, а другая — от отца. Двойной набор хромосом соматической клетки называют диплоидным, а половинный набор в зрелых половых клетках — гаплоидным (простым, одинарным). При делении клетки каждая из дочерних клеток получает такое же количество хромосом, какое имела материнская клетка.

Известно, что хромосомы содержат ДНК, РНК и белки. Диплоидный набор хромосом соматических клеток содержит вдвое больше ДНК, чем гаплоидные клетки. Половые клетки содержат только половинное количество ДНК, подобно тому, как в этих клетках содержится половинное число хромосом. В процессе клеточного деления ДНК увеличивается количественно. Происходит самовоспроизведение (ауторепродукция) каждой из хромосом; в обеих дочерних клетках распределяется одинаковое количество ДНК, по химическому составу совершенно идентичное ДНК родительской клетки. Именно молекулы ДНК передают наследственные признаки организма (генетическую информацию). Способностью к самовоспроизведению обладает и РНК.

Изменчивость организма тесно связана с химическими изменениями ДНК, т. е. с образованием мутаций. Мутацией можно назвать изменение одного мономерного (нуклеотидного) звена в цепи ДНК. Каждому химическому (мутационному) изменению в молекуле ДНК соответствует вполне определенное изменение аминокислотного звена в цепи синтезируемого белка.

Гены, определяющие пару контрастных друг к другу признаков, называют аллельными друг к другу. Аллели способны в результате мутаций переходить одна в другую.

Гамета — половая клетка; зигота — оплодотворенная яйцеклетка. Если соединяются две гаметы, различные по содержащимся в них генам, то оплодотворенную яйцеклетку и развивающуюся из нее особь называют *гетерозиготой*. Если же сливаются гаметы, совершенно идентичные по содержащимся в них генам, то образуется *гомозигота*. Когда один из обоих генов аллельной пары преобладает над другим, то этот ген называют *доминантным*. Аллель, действие которой при этом подавляется, называют *рецессивной*.

Для наследственности *аутосомно-доминантного* типа характерна прямая передача болезни от родителей детям, причем больной родитель в браке как с больным, так и со здоровым может иметь детей и больных и здоровых. В потомстве от брака больного со здоровым число больных детей в среднем равняется числу здоровых.

При *аутосомно-рецессивном типе* наследования заболевают дети здоровых родителей, причем сами больные в браке со здоровыми имеют здоровых детей. Относительно часто больные дети рождаются от родителей, состоящих в кровном родстве. Как правило, рецессивные формы протекают тяжелее доминантных.

Вся хромосома — это цепь линейно расположенных генов, которые способны самостоятельно изменяться (мутировать). Доказано, что в основе перестройки генетического материала, то есть возникновения мутаций, лежит изменение порядка нуклеотидов. Такая мутация может изменить самые разнообразные свойства молекулы, слагающейся под управлением гена. И если она изменяет фермента-

тивные свойства, то это может разорвать цепь тех реакций, в которых данный белок-фермент принимает участие. Вот здесь и происходит «ошибка» обмена веществ со всеми вытекающими отсюда, иногда катастрофическими для организма последствиями.

Попытаемся разобраться в различных возможностях «блокирования» путей, по которым протекают химические превращения в организме, для этого рассмотрим следующий пример [3].

Представим себе цепь реакций, в которых принимают участие три фермента, в построении молекул которых по принципу «один ген — один фермент» принимают участие три гена:

Ген АБ — Ген БВ — Ген ВГ

А —фермент АБ→ Б —фермент БВ→ В —фермент ВГ→ Г

Если ген ВГ, вследствие мутации, станет дефектным, это отразится на активности фермента ВГ и последовательность реакций будет блокирована на участке ВГ:

А ⟶ Б ⟶ В —//→ Г

К каким последствиям это может привести?

1. К заболеванию, вызванному отсутствием продукта реакции *Г* или веществ, которые должны бы из него образоваться. Примеры: гликогенная болезнь, кретинизм, адреногенитальный синдром или, наконец, альбинизм (см. ниже соответственные разделы).

2. Накопление продукта *В*, непосредственного предшественника той реакции, которая была блокирована:

А ⟶ Б ⟶ В В В —//→ Г

Примеры вытекающих отсюда заболеваний — см. ниже (гликогенная болезнь или, когда продукт В накапливается в таком количестве, что повышается его выделение с мочой, как это происходит при алкаптонурии).

3. Накопление продуктов А или Б, «отдаленных» предшественников блокированной реакции:

АА АА АА ⇄ Б Б ⇄ В —//— Г

Клинический пример — болезнь Гирке (см. ниже).

4. Образование продуктов, встречающихся в здоровом организме, но обычно имеющих второстепенное значение. Клинический пример:

фенилкетонурия (см. ниже):



5. Образование совершенно нового продукта Г[1].

А ——→ Б ——→ В ——→ Г[1]

Теоретически это возможно, но практически из известных заболеваний к этому «типу» приближается только семейный первичный амилоидоз (см. ниже).

6. Наконец, ошибка обмена может иметь следствием не блокирование какого-либо участка цепи ферментных реакций, а изменения: скорости этих реакций; природы веществ, ускоряющих (активаторов) или тормозящих (ингибиторов) ферментные реакции; проницаемости клеточных и внутриклеточных мембран (оболочек); «размещения» ферментов и других веществ внутри клетки. И все это может клинически проявляться по-разному.

Как указывает Н. П. Дубинин [4], в ауторепродукции заключен не только механизм воспроизведения молекулярного строя хромосом, имевшего место в родительских клетках, но и механизм, мгновенно закрепляющий всякие молекулярные преобразования, которые могут возникать в генетическом материале хромосом (см. также [5]).

Аномалии обмена углеводов

Галактоземия

Галактоземия означает повышенное содержание галактозы в крови. Но это только буквальный перевод термина, которым обозначают наследственную болезнь, главным образом у детей. Болезнь эта проявляется увеличением содержания галактозы в крови (гипергалактоземия), выделением этого сахара в моче (галактозурия), выделением аминокислот и белков с мочой; в дальнейшем отмечается упадок питания, замедленное развитие ребенка, сильное увеличение размеров печени и селезенки и последующий цирроз печени, катаракта глаз и слабоумие.

Собственно наследственная галактоземия, которую можно назвать «галактозным диабетом» (она сопровождается повышенным выделением галактозы с мочой — галактозурией), довольно редкое заболевание. Открыто оно сравнительно недавно. Около 60 лет назад один немецкий врач [3в] обратил внимание на восьмимесячного ребенка в состоянии резкого упадка питания, с сильно увеличенной печенью, выделявшего с мочой сахар. После отнятия от груди младенец, не получая молока, выделять сахар перестал, но все же погиб. Вскрытие показало резко выраженный цирроз печени. Так как родители давали ребенку коньяк, вредивший печени, врач (со-

вершенно обоснованно) не связал наблюдавшееся им прекращение выделения сахара в моче с отнятием младенца от груди, т. е. с лишением его молока. Через 20 лет было сделано другое наблюдение, а именно, что четверо братьев и сестер в одной семье выделяли сахар в моче, пока получали грудное молоко. Постепенно картина стала уточняться и десять лет назад было отмечено всего около 50 случаев галактоземии. За последнее десятилетие цифра эта удвоилась. Удалось проследить за галактоземией в четырех поколениях одной семьи, затем в трех родственных семьях, затем в 13 семьях и т. д., а главное — удалось полностью выяснить биохимические основы этой болезни [36].

Молоко матери содержит галактозу в составе молочного сахара — лактозы. Откуда берется эта галактоза? Известно, что галактоза и глюкоза химически близкие соединения. Источником галактозы для молочного сахара является глюкоза, содержащаяся в крови матери. Несмотря на большое сходство строения глюкозы и галактозы, одна в другую они превращаются при помощи целой системы ферментов, о которых речь идет ниже. Образовавшаяся лактоза, попадая вместе с молоком в желудочно-кишечный тракт, проходит его сначала «нетронутой» и только в кишечнике ферментлактаза расщепляет ее на две молекулы: глюкозы и галактозы. Вместе с глюкозой галактоза всасывается из кишечника в кровь и доставляется в печень, где превращается в главное топливо организма — глюкозу. Вот здесь и удалось открыть ошибку обмена веществ, влекущую возникновение болезни.

Что же происходит при этом?

Начинается процесс с присоединения к галактозе одной молекулы фосфорной кислоты за счет АТФ. Эту реакцию ускоряет фермент галактокиназа, в результате чего образуется галактозо-1-фосфат. Затем в реакцию вступает глюкоза, которая предварительно соединяется с уридином (составная часть рибонуклеиновой кислоты) и фосфорной кислотой, образуя уридиндифосфат-глюкозу. Последняя, под воздействием специального фермента — галактотрансферазы — обменивается с галактозой галактозо-1-фосфата, в результате чего глюкоза выходит из реакции в виде глюкозо-1-фосфата; именно в таком виде она активируется и способна к дальнейшим превращениям. А галактоза, ставшая уридилдифосфат-галактозой, подвергается воздействию фермента эпимеразы, специфической особенностью которого является ускорение перемещения атомов внутри молекулы (эпимеризация), и превращается в уридилдифосфат-глюкозу. На эту последнюю действует фосфорная кислота (реакцию ускоряет фермент пирофосфат-фосфорилаза), в результате чего образуется глюкозо-1-фосфат, который используется в обмене веществ. Тут же образуется и уридилтрифосфат.

Теперь уже можно совершенно точно указать, где происходит «ошибка». В клетке не синтезируется молекула белка-фермента галактотрансферазы — или же допускается ошибка (аномалия), приводящая к резкому понижению активности этого фермента.

Можно ли «защитить» ребенка, родившегося от больных галактоземией, от вредного действия галактозы (из лактозы молока), увеличения и цирроза печени, появления катаракты на глазах, слабоумия? Давно уже было известно, что галактозу в некоторой степени можно считать ядовитым сахаром. Если давать цыплятам галактозу, то она вызывает судороги (поражение мозга), а дача этого сахара крысам влечет появление катаракты на глазах. То же наблюдается и у детей, больных галактоземией. И повреждения печени можно вызвать у животных дачей галактозы, хотя и не с тем постоянством, как это наблюдается у больных детей. Правда, у новорожденных печень еще не работает в полную силу, функции ее еще несовершенны и этим можно частично объяснить то обстоятельство, что дача галактозы детям влечет ненормальное повышение этого сахара в крови (гипергалактоземию) и выделение в моче (галактозурию), тогда как взрослые переносят нагрузку галактозой легче. Но все же поводов для заключения о ядовитости галактозы достаточно; возможно, что такая ядовитость объясняется изменением проницаемости тканей под влиянием этого сахара. Действительно, достаточно ввести галактозу крысам внутривенно, как через несколько минут начинает возникать катаракта глаз. С другой стороны, был подмечен антагонизм между глюкозой и галактозой; достаточно ввести в организм галактозу, как уровень глюкозы в крови начинает снижаться, а уровень галактозы повышаться. Можно предположить, что галактоза служит причиной относительного глюкозного голодания, что и обусловливает ее ядовитость.

Удалось вырастить такую культуру кишечной палочки, которая из-за отсутствия специфических ферментов была лишена возможности метаболизировать, т. е. подвергать галактозу химическим превращениям [3г]. К культуре, лишенной фермента галактокиназы, добавили галактозу, но это не отразилось на росте микробов. Когда же галактозу прибавили к культуре микробов, лишенных трансферазы, рост микробов остановился и, что самое интересное, в микробных клетках накопился галактозо-1-фосфат. Отсюда вывод: ядовитое действие оказывает не сама галактоза, а ее активированная форма: галактозо-1-фосфат. Каким образом это может происходить? Предположений здесь несколько. Во-первых, галактозо-1-фосфат может служить как бы ловушкой для фосфорной кислоты и, тем самым, уменьшать ее запасы. А соединение с фосфорной кислотой — это начало всех химических превращений глюкозы. Во-вторых, галактоза может отнимать фосфорную кислоту (фосфат) у АТФ (этого универсального поставщика энергии для всех процессов обмена веществ в нашем теле) и, наконец, галактозо-1-фосфат может оказывать тормозящее действие на ряд ферментов, участвующих в превращениях глюкозы, а это, естественно, может дезорганизовать использование глюкозы и, в частности, уменьшать количество глюкозы, переходящей из печени в кровь.

С накоплением галактозо-1-фосфата в клетках организма можно бороться. Предварительные результаты указывают, например, что

один из стероидных гормонов—прогестерон — способствует нормализации превращений галактозы у больных галактоземией, что такое же действие может оказать и обыкновенный ментол [3]. Но все это пока поиски. Единственным верным способом лечения является устранение галактозы (и ее источника — молочного сахара) из питания больных. Интересно, что с возрастом человек начинает лучше переносить галактозу. Очевидно, это объясняется тем, что у взрослых людей печень становится полноценной и функционирует лучше. У грудных младенцев печень еще несовершенна. Тем важнее уметь с первых же дней, а то и часов жизни новорожденного открыть возможную ошибку обмена. Это позволит, в случае надобности, с первых же дней жизни ребенка перевести его на диету, лишенную молочного сахара, и тем самым избежать тяжелых последствий обычного питания (молоко категорически противопоказано). Еще недавно диагноз болезни ставили только на основании перенесения больным ребенком добавочной (кроме получаемой с молоком) порции галактозы, а этот способ был далеко не безопасен. Современная медицина может ставить диагноз уже в первые часы жизни младенца, определяя активность специфического фермента в эритроцитах. Заметим тут же, что галактоземия и галактозурия могут быть не только врожденными, но и благоприобретенными. Поскольку нарушения обмена галактозы в основном происходят в печени, можно ожидать, что при некоторых повреждениях печени (а такие повреждения могут быть различной природы — вспомним печень алкоголиков) создаются условия, затрагивающие ту систему ферментов, которая ведает превращениями галактозы. У взрослых это может быть установлено после нагрузки галактозой, на которую люди с больной печенью реагируют совершенно иначе, чем здоровые люди. Маленькие дети отвечают на нагрузку галактозой так, как взрослые с больной печенью. И это несовершенство детской печени необходимо всегда иметь в виду при подозрении на врожденную галактоземию.

Интересно, что больные галактоземией выделяют резко повышенное, ненормальное количество аминокислот в моче. По некоторым данным [36], причиной этого явления служит недостаток в работе почек, возможно врожденный (и здесь ошибка обмена веществ) или обусловленный «ядовитостью» галактозо-1-фосфата, изменяющей проницаемость почек.

Пентозурия

Пентозурия — выделение с мочой пентоз-моносахаридов с пятью атомами углерода. Можно вызвать пентозурию, обильно питаясь сливами, вишнями или земляникой, которые богаты пентозой.

Но так называемая эссенциальная пентозурия представляет хроническое расстройство обмена веществ, не зависящее от содержания пентоз в пище. Это довольно редко встречающаяся (1 случай на 50 000) врожденная ошибка обмена аутосомно-рецессивного типа,

выражающаяся в ежедневном выделении с мочой 1—4 г пентозы: L-ксилулозы возобидное для оргдиабетом пентозурия, фактически совершенно гликает, на какихханизма нарушение обмена, не имеет. Как она возникает, на каких путях обмена совершается ошибка?

Обмен глюкозы может идти разными путями. Тот путь, который ведет бкпентозурии, можно назвать побочным, второстепенным. Это явявству и из того, что лица с хронической пентозурией никак от этого не страдают (если не считать того, что их ошибочно считают больными диабетом). Но выделение L-ксилулозы с мочой свидетельствует о том, что где-то на данном пути произошла ошибка. Где именно? Имеются основания предполагать [36], что в некоторых случаях начальная реакция превращения глюкозы в глюкозо-6-фосфат на какой-то стадии начинает идти по пути образования глюкуроновой кислоты. Вот эта-то кислота и является предшественником L-ксилулозы, так как образует гулоновую, затем кетогулоновую кислоту, из которой уже образуется L-ксилулоза. И здесь цепь превращений обрывается, возможно, из-за наследственного дефекта в том ферменте, который «должен бы» превратить L-ксилулозу в ксилитол и т. д. Вместо этого неизмененная L-ксилулоза выделяется с мочой.

Хроническая пентозурия не требует лечения. Надо только уметь отличать ее от диабета, выявляя L-ксилулозу в моче при помощи хроматографии на бумаге.

Фруктозурия

Фруктозурия представляет редкое расстройство обмена, при котором плохо используется и выделяется с мочой фруктоза. Тип наследования аутосомно-рецессивный. Существуют две формы фруктозурии. Одна доброкачественная, которую ошибочно можно принять за диабет. Частота распространения этой формы фруктозурии приблизительно 1 : 130 000.

Место ошибки обмена при доброкачественной фруктозурии не установлено. Начинается обмен фруктозы с превращения ее в фруктозо-1-фосфат. В печени этим превращением ведает специальный фермент фруктокиназа. Очевидно, именно здесь происходит ошибка обмена и недостаток фруктокиназы влечет фруктозурию. Возможно, некоторую роль играет альдолаза, недостаток которой мешает использованию образовавшегося фруктозо-1-фосфата. Точных сведений пока нет. Однако имеются основания полагать, что дефект этого фермента (точнее фруктозо-1-фосфатальдолазы) обусловливает качественно другую, гораздо более тяжелую (и более редкую) форму фруктозурии, тоже аутосомно-рецессивного типа наследования. Это заболевание было установлено у детей одной швейцарской семьи [36]. Прием фруктозы вызывал у них тошноту, рвоту и одновременно сильное падение содержания глюкозы в крови. Эта форма фруктозурии вызывает задержку физического развития и умственную отсталость.

Больные слабовыраженной фруктозурией в лечении не нуждаются. Что касается тяжелой формы, то здесь показано строжайшее исключение фруктозы во всех видах (следовательно, и обычного сахара) из пищи. В обоих случаях необходим тщательный анализ мочи на содержание глюкозы, чтобы исключить наличие диабета.

Аномалии обмена гликогена

Гликоген в печени и в мышцах распадается главным образом при участии фосфорилазы. Этот фермент, в тесном сотрудничестве с глюкозо-6-фосфатазой, ведает как распадом гликогена с образованием глюкозы, так и синтезом гликогена из глюкозы. При этом попутно образуется глюкозо-6-фосфорная кислота и только из этого соединения может освободиться глюкоза, которая переходит затем в кровь. Ясно, что для этого в печени необходима глюкозо-6-фосфатаза. А если этого фермента нет или его недостаточно? Встречается заболевание, при котором отложение гликогена в печени превышает всякие нормы. При этом чаще всего печень увеличивается, уровень сахара в крови снижается, а рост ребенка задерживается, потому что, хотя глюкоза и усваивается печенью, гликоген теряет способность распадаться или распад его идет крайне медленно из-за недостаточности глюкозо-6-фосфатазы. Эту болезнь описал в 1929 г. Гирке. При болезни Гирке содержание сахара в крови сильно понижено; содержание холестерина и жиров, наоборот, резко повышено. В моче появляется ацетон, что объясняют повышенным разложением жиров в связи с недостатком углеводов. В печени содержание гликогена доходит до 4%, часто повышено содержание жира. Болезнь особенно опасна в первые четыре года жизни. Больных лечат частой круглосуточной дачей небольших количеств углеводов, поддерживающей уровень сахара в крови, но не способствующей быстрому отложению гликогена. Пища должна содержать много белков, из которых глюкоза образуется как бы окружным путем. Ближайшей причиной гибели обычно являются инфекции и ацидоз, возникновение которых необходимо предупреждать. Для лечения инфекций применяют антибиотики и внутривенные вливания глюкозы, ацидоз устраняют дачей бикарбоната. Выявлено, что применение препаратов тироксина и гликогена дает хорошие результаты [36].

Иногда отложение гликогена происходит в мышцах, особенно в сердце. У таких больных на первый план выступает большая мышечная слабость. И здесь причиной служит недостаток ферментов. Иногда, вследствие недостаточности фосфорилазы, начинающей расщеплять гликоген, распад этого полисахарида приостанавливается в самом начале. Если это недостаток фосфорилазы печени, мы имеем дело с болезнью Херса. Она крайне редка и мало изучена. Иногда «ошибка» обмена сказывается в отсутствие трансглюкозидазы, обеспечивающей перенос углеводов при расщеплении молекулы гликогена. Неразветвленная цепочка распадается крайне медленно.

В результате гликоген отлагается в печени, селезенке, лимфатических узлах. Болезнь очень трудно распознать. Достоверно известен только один случай, описанный Андерсеном и кончившийся гибелью ребенка [36]. Болезнь Помпе (идиопатический генерализованный гликогеноз) проявляется слабоумием, мышечной слабостью, расширением сердца, различными нервными расстройствами. Биохимически она прежде всего проявляется в чрезмерном отложении гликогена в сердце, очевидно вследствие недостаточности фермента, обеспечивающего превращение глюкозы через глюкозо-6-фосфат и глюкозо-1-фосфат в гликоген. Болезнь встречается очень редко (известно менее 30 случаев), но очень тяжела и кончается смертью от недостаточности сердца уже на первом году жизни. Болезнь Форбса по своим проявлениям напоминает болезнь Гирке, но протекает несколько мягче и встречается еще реже. Ошибка обмена в этом случае выражается в недостаточности амило-1,6-гликозидазы (способствующей распаду гликогена), вследствие чего гликоген откладывается в печени, мышцах, сердце. Уровень глюкозы в крови при этом падает (гипогликемия). Но поскольку активность глюкозо-6-фосфатазы при этом не затрагивается, организм может использовать глюкозу из других источников. Поэтому больных лечат диетой с высоким содержанием белка, служащего «косвенным» источником необходимой глюкозы, а жиров дают очень мало. Некоторые авторы рекомендуют также лечение глюкагоном. Болезнь Мак-Ардля очень редка (известно менее 10 случаев), характеризуется сравнительно умеренным отложением гликогена в скелетных мышцах, вызванным полной недостаточностью фосфорилазы мышц, но не печени, фосфорилаза которой функционирует нормально. Пока не выяснено, имеется ли дефект и фосфорилазы сердечной мышцы. Болезнь характеризуется болью и резкой слабостью мышц после кратковременной работы. Как известно, в крови здоровых людей после мышечной работы повышается содержание молочной и пировиноградной кислот. В крови больных этой болезнью уровень молочной и пировиноградной кислот после мышечной работы не изменяется, и это характерный признак болезни. При этой болезни повреждение биохимических систем мешает использованию во время работы запасного «топлива» — глюкозы из мышечного гликогена. При болезни Мак-Ардля больным разрешают только кратковременную физическую работу. По некоторым сведениям полезно внутривенное введение глюкозы или фруктозы. И, наконец, мышечный гликогеноз отмечается при болезни Сент-Аньезе, очень редкой и малоизученной.

Таким образом, известно семь различных форм болезни, сопровождающейся отложением гликогена, причем почти в каждой форме обнаружен недостаток особого фермента. Недавно была открыта болезнь, носящая совершенно «обратный» характер, хотя и здесь замешан гликоген. При этом заболевании почти полностью отсутствует гликоген в печени (агликогеноз). У больных детей (братьев и сестер в одной и той же семье) наблюдается умственная отсталость, резкое падение содержания глюкозы в крови (гипогликемия), по

утрам судороги, которые можно предотвратить частым и регулярным кормлением ночью. Шаг за шагом была проверена активность ферментов, участвующих в обмене гликогена, и удалось напасть на след биохимического «повреждения». Ошибка обмена веществ выразилась в отсутствие фермента гликогенсинтетазы.

Выяснение биохимических нарушений, являющихся причиной молекулярных болезней типа гликогенозов и агликогенозов, дало возможность начать разработку методов молекулярной диагностики и даже молекулярной терапии лечения. Такая диагностика, конечно, затруднена, если отсутствие фермента, ответственного за тот или иной тип заболевания, наблюдается только в печени или мышцах. Но задача облегчается, когда соответствующий фермент отсутствует и в крови, например в ее форменных элементах. А для установления болезни Гирке, т. е. гликогеноза, вызванного отсутствием фермента глюкозо-6-фосфатазы, можно исследовать полость рта. Болезнь Форбса можно распознать по ненормальному строению гликогена в лейкоцитах, болезнь Андерсена — по этому же признаку в эритроцитах. Таким образом, уже имеются более или менее доступные способы химической диагностики.

В связи с этим можно отметить, что такие методы разработаны не только для гликогенозов, но и для наследственных заболеваний, связанных с непереносимостью других углеводов пищи. Это редкие заболевания детей, но они носят тяжелый характер, так как сопровождаются поражением печени и почек, потерей в весе, поносами и часто приводят к гибели. Причиной этих заболеваний является отсутствие в слизистой кишечника ферментов, участвующих в расщеплении различных сахаров, в частности продуктов частичного расщепления крахмала—мальтозы и изомальтозы. Наличие или отсутствие соответствующих ферментов определяется при помощи биопсии слизистой кишечника и выделения этих ферментов. Таким образом из слизистой кишечника было выделено несколько отличающихся по свойствам дисахараз.

Ошибка обмена веществ выражается в нарушении биосинтеза одной или нескольких дисахараз, причем пока еще не удалось выяснить, является ли это результатом одной или нескольких мутаций.

Болезнь можно установить по тому, что дача больному соответствующего сахара не сопровождается обычным подъемом содержания сахара в крови. Такие болезни успешно лечат, давая больным соответствующие ферменты, например препарат дрожжевой амилазы.

Интересен другой путь, разработка которого сулит хорошие перспективы для молекулярной терапии. В некоторых случаях уже удается индуцировать дачей специальных гормонов синтез в организме таких ферментов, действие которых отличается полным сходством с действием отсутствующих ферментов. Другими словами, можно искусственно исправлять аномалии обмена веществ [3]. Так, например, при болезни Гирке с успехом применяют синтетический андрогенный гормон галотестин.

В настоящее время разрабатывается еще один, весьма перспективный способ вмешательства путем воздействия на самый процесс мутации [4]. Открыты такие химические вещества, которые подавляют течение мутации. Они могут получить большое применение для борьбы с врожденными заболеваниями [3].

Почему сахарный диабет относят к наследственным болезням? Массовыми обследованиями доказано, что частота диабета среди родственников в несколько раз превышает таковую среди других людей. Кроме того, если диабетом заболевает один из однояйцевых близнецов, то почти в 2/3 случаев болезнь можно обнаружить и у другого. В большинстве случаев диабет наследуется рецессивно. Аномальный ген, «ответственный» за предрасположение к диабету, широко распространен. По данным пятилетней давности, в США диабетом болело 3 миллиона человек [3б].

То, что «ошибка» обмена веществ связана с недостаточностью ферментативного синтеза инсулина, сомнений не вызывает. Однако точное место блокады пока еще не выяснено.

Нарушения аминокислотного обмена

Алкаптонурия, фенилкетонурия, тирозиноз, альбинизм и другие «ошибки» обмена веществ—так назвал неизвестные в то время (в начале нашего века) молекулярные болезни Гаррод [3г], впервые обративший на них внимание. Ошибки, и притом врожденные. Классическим примером такого нарушения обмена веществ стала алкаптонурия, проявляющаяся в потемнении (иногда в почернении) мочи при длительном стоянии на воздухе. Откуда же появляется это темное красящее вещество — алкаптон?

При распаде белков в клетках нашего тела образуются аминокислоты, в том числе тирозин и фенилаланин. Подвергаясь дальнейшим превращениям, эти аминокислоты образуют так называемую гомогентизиновую кислоту. В здоровом организме эту кислоту окисляет фермент оксидаза. Но когда обмен веществ протекает с некоторым отклонением от нормы, этот белок-фермент не синтезируется и гомогентизиновая кислота выделяется с мочой. При стоянии мочи эта кислота, особенно в присутствии щелочи, жадно присоединяет кислород и образует алкаптон (что означает «жадно поглощающий щелочь»).

Темная, почти черная моча легко обращает на себя внимание; не удивительно, что об этой болезни знали уже сотни лет назад. Но только Гаррод сумел распознать в ней наследственный дефект специального фермента, что было подтверждено уже в наши дни химическим исследованием печени больных. Осложнением болезни являются отложения темноокрашенных продуктов окисления гомогентизиновой кислоты в суставных хрящах и заболевания суставов.

Алкаптонурия — наследственная болезнь аутосомно-рецессивного типа. Частота — порядка 3—5 случаев на миллион. Больные нуждаются в лечении, но радикальных способов возмещения недо-

стающего фермента пока не имеется. Ограничение фенилаланина и тирозина в диете ведет к снижению выделения гомогентизиновой кислоты, оно допустимо только на очень короткие периоды времени (фенилаланин — незаменимая аминокислота). Имеются данные [3б], что большие дозы аскорбиновой кислоты предупреждают отложение темного пигмента («охроноз»).

Гораздо неприятнее по своим последствиям другая ошибка обмена веществ наследственного характера. В этом случае из фенилаланина образуется не тирозин, а (ввиду отсутствия или недостаточности специального фермента гидроксилазы) фенил-пировиноградная кислота, которая (с небольшим числом других веществ) выделяется с мочой. В крови, спинномозговой жидкости и тканях накапливаются значительные количества фенилаланина, что ведет в первые же месяцы жизни к тяжелому поражению центральной нервной системы, а в дальнейшем — к неизлечимому слабоумию. Эта наследственная болезнь также аутосомно-рецессивного типа. Известно 1000 случаев такой «фенилкетонурии» [3б]. Она мало распространена среди взрослых, главным образом вследствие гибели больных еще в детском возрасте.

Лечение необходимо проводить с самого раннего возраста, так как поражение ткани мозга уже необратимо. Установить наличие болезни можно при помощи простой пробы на орто-оксифенилуксусную кислоту, которую больные выделяют с мочой[1].

К свежей моче прибавляют несколько капель 5%-ного раствора треххлористого железа и, после появления осадка фосфатов, добавляют еще 3—4 капли того же реактива. При наличии в моче орто-оксифенилуксусной кислоты появляется оливково-зеленое окрашивание. Более сложно определение в крови фенилаланина, содержание которого у больных повышено в несколько десятков раз по сравнению с нормой. Лечение заключается в постоянном (но осторожном и при постоянном наблюдении за уровнем фенилаланина в крови) ограничении поступления фенилаланина с пищей. Необходимое количество калорий обеспечивают главным образом за счет углеводов и жиров [3б].

Следует отметить, что наследственной является неспособность организма синтезировать гидроксилазу фенилаланина, а не сама фенилкетонурия, которая является следствием этого дефекта.

Еще реже (фактически известен только один достоверный случай [3б]) проявляется ошибка обмена в отношении того же тирозина, носящая название «тирозиноза». В этом случае блокируется ферментный участок обмена после превращения тирозина в пара-оксипировиноградную кислоту, в результате чего резко повышается выделение этой кислоты (и тирозина) с мочой.

Если исходить из химической основы заболеваний, то к той же группе можно отнести и не так редко встречающийся «альбинизм».

[1] В Англии широко распространен простой способ раннего диагноза. Бумажку, пропитанную реактивом (5% $FeCl_3$), кладут в пеленки новорожденных [3в].

Альбиносы — люди с совершенно белыми волосами и кожей и розово-красными глазами, что является следствием отсутствия красящего вещества—меланина. Есть много оснований предполагать, что у этих людей недостает ферментов, участвующих в окислении аминокислот тирозина или диоксифенилаланина (ДОФА [36]).

При окислении этих веществ у нормальных людей образуется меланин, а у альбиносов он не образуется. Пока еще не все причины развития альбинизма выяснены полностью. Альбинизм наследуется рецессивно. Частота — около 5 случаев на 100 000.

При первичной гипероксалурии наблюдается повышенное выделение оксалатов с мочой и повышенное образование их; кристаллы оксалатов появляются в почках. Речь идет о наследственной (рецессивного типа) болезни, которая начинается приблизительно в возрасте 1—4 лет, длится около четырех лет и кончается гибелью ребенка. Признаки болезни: повторные приступы почечных колик, гематурия и выход камней, состоящих из оксалата кальция. На рентгеновских снимках почти всегда можно найти камни в обеих почках. Болезнь необходимо отличать от обычной почечнокаменной болезни, при которой более чем в половине случаев камни тоже состоят из оксалатов. Многие авторы связывают эту благоприобретенную болезнь с обильным содержанием щавелевой кислоты в пище, хотя это нельзя считать доказанным. Что касается наследственной первичной гипероксалурии, то место ошибки обмена веществ пока не установлено. Теоретически возможен недостаток глиоксиловой кислоты, которая в организме является химическим предшественником щавелевой кислоты на путях обмена и, вероятно, здесь сказывается дефект соответствующего фермента.

Способы лечения этой тяжелой болезни пока не разработаны. В литературе описаны 14 случаев [36].

Лейциноз, или «болезнь кленового сиропа», характеризуется повышенными количествами лейцина, изолейцина и валина в моче. При этом заболевании характерен запах кленового сиропа у мочи. Еще более типичным признаком является кетоацидурия. Поиски привели к следующим результатам. В крови было обнаружено накопление упомянутых выше аминокислот. Анализ тканей показал, что эти аминокислоты нормально превращаются в кетокислоты. Задержка обнаружена на следующем этапе — окислительном декарбоксилировании кетокислот, которые в здоровом организме должны превращаться в простые кислоты: изомасляную и изовалериановую. В больном организме этого не происходит, очевидно, из-за недостатка соответствующего фермента.

Основная профилактика заключается в возможно раннем переводе на пищу с ограничением указанных аминокислот. Болезнь проявляется с первых дней жизни не только характерным запахом мочи, но и одновременной рвотой и мышечной слабостью с задержкой умственного развития. Болезнь встречается очень редко. В литературе описано несколько случаев, в том числе заболевание четырех из шести детей одной семьи [36]. Более детально были изучены два

случая (дети из разных семей). Эта аномалия нуждается в дальнейшем исследовании.

Цистиноз — редкое заболевание детей, наследующееся преимущественно по рецессивному типу. При этом малорастворимый цистин как бы выпадает из обмена и отлагается во всех органах и тканях. Это очень тяжелое врожденное заболевание, которое не надо смешивать с цистинурией (см. ниже).

В литературе описано около 60 случаев [3б]. При остром течении болезни дети гибнут на 2—3-м году жизни, но при хроническом могут дожить до юношеского возраста. Болезнь проявляется в потере аппетита, повышенной жажде, рвоте, повышенной температуре, светобоязни, задержке развития. Развивается картина тяжелого рахита. Характерный признак — повышенное выделение аминокислот с мочой (гипераминоацидурия), особенно лейцина, пролина и валина. Цистин откладывается в костном мозге, ретикуло-эндотелиальной системе, роговице и конъюнктиве глаза (важно для установления диагноза).

Где происходит ошибка обмена веществ в обмене цистина? Очевидно, по пути его превращений. Этот путь изучен хорошо: метионин, теряя один атом углерода, превращается в гомоцистеин, который, через промежуточное соединение — цистатионин, передает серу серину, превращая его в цистеин; две молекулы последнего, легко уступая два водородных атома (и так же легко, «в случае надобности», их присоединяя), соединяются, образуя молекулу цистина, который должен окисляться в сульфат.

В этих превращениях принимает участие ряд ферментов, но где именно происходит врожденная ошибка — в образовании или распаде цистина, пока установить не удалось.

Предложено несколько способов лечения цистиноза; все они дают некоторый эффект. Длительное применение витамина Е (или витамина B_{12}) способствует восстановлению дисульфидных групп в молекуле цистина и лучшему использованию образовавшегося цистеина [3б].

Борьбу с рахитом (при котором сильно понижено содержание фосфора в крови) ведут внутривенными вливаниями неорганического фосфора (с ежедневным контролем его содержания в крови) или дачей больших доз витамина D.

Рекомендуется также применять большие дозы (50 *мг* в сутки) аденозинмонофосфата натрия, как источника энергии для стимуляции белкового и (аминокислотного) обмена [3б].

Наследственный зоб. Эта болезнь тесно связана с той ролью, которую в нашем теле выполняет щитовидная железа. Все гормоны щитовидной железы содержат йод и все они являются производными тирозина. Щитовидная железа обладает способностью извлекать йод из притекающей к ней крови и интенсивно включать его в тирозин и его производные. Все этапы образования гормонов находятся под «контролем» соответствующих ферментов и биохимические «повреждения», врожденные ошибки обмена веществ, могут затра-

гивать разные участки. Но какой бы этап ни был задет этим дефектом, это в той или иной степени отражается на продукции гормонов щитовидной железой. Существует несколько типов наследственного зоба, в зависимости от характера аномалии, лежащей в их основе: 1) нарушение превращения неорганического йода в его органическую форму, т. е. в йодсодержащее производное тирозина; 2) такое же биохимическое «повреждение», но с менее тяжелыми последствиями; 3) нарушение способности продуцировать гормоны — тироксин и трийодтирозин из их предшественников — монойод- и дийодтирозина; 4) дефект фермента дейодиназы йодтирозина; 5) появление йодсодержащих пептидов, переходящих из железы в сыворотку крови.

Для распознавания этих форм заболевания пользуются наблюдением за передвижением в крови и щитовидной железе введенного йода с радиоактивной меткой.

Наследственный зоб не надо смешивать с благоприобретенным эндемическим зобом, вызванным недостатком йода во внешней среде. Впрочем, имеются данные, что различные семьи по-разному реагируют на этот недостаток, что, очевидно, свидетельствует о наследственном различии в чувствительности к нему. При недостатке йода ткань щитовидной железы разрастается и усиленно вырабатывает слизистую жидкость, которая растягивает фолликулы, выделяющие тиреоглобулин. В результате развивается зоб, причем вес железы может достигать 4—5 *кг*. Иногда железа полностью или почти полностью прекращает свою деятельность. Это приводит к микседеме.

Наследственный зоб лечат тироксином и препаратом высушенной щитовидной железы. Если мать уже рожала детей с врожденным кретинизмом, то ей можно давать во время беременности большие дозы сухой щитовидной железы и, таким образом, лечить зародыш через плаценту. Результаты получаются хуже, когда лечение не начато рано, а также если оно прерывается.

При развитом зобе и резком отставании развития лечение требует осторожности и обычно не дает удовлетворительных результатов. Наследственный характер зоба хорошо установлен. В некоторых случаях удавалось проследить за болезнью в одной семье на протяжении более ста лет. Например, за 160 лет в одной шотландской семье в различных поколениях появилось 10 кретинов на 30 членов семьи [36]. Был установлен аутосомно-рецессивный тип наследования.

По сравнению с другими наследственными болезнями зоб нельзя считать редким заболеванием. В литературе описаны сотни случаев различных форм этого зоба, с разной частотой проявления для каждой из них.

Аномалии обмена липидов (липидозы)

Наследственные болезни обмена липидов затрагивают различные стороны превращений этих веществ. Их можно разделить на две группы: 1) первичные семейные липидозы, для которых характерно

повышение содержания липидов в крови, и 2) семейные липидозы, характеризуемые накоплением сложных липидов—сфинголипидов — внутри клеток.

Остановимся на болезнях первой группы. Более тридцати лет назад немецкие врачи Бюргер и Грюти [3б] обратили внимание на больного с увеличенной печенью и селезенкой, с приступами острых болей в животе, особенно после принятия жирной пищи, с появлением желтых опухолей (ксантом) на коже, с повышенной мутностью плазмы крови. В крови оказалось сильно повышено содержание жиров (гиперлипемия) в виде мелких капелек (хиломикронов). Болезнь в общем протекала легко. Наследственный, семейный характер ее (большей частью доминантного типа) был установлен несколько позднее и прослежен приблизительно на 40 случаях, описанных в литературе [3б]. Только в одной семье удалось установить наследственный «изъян» в липазе липопротеинов. В других случаях предполагаются иные нарушения обмена, в частности блокада обмена жиров и замедленное выведение хиломикронов плазмы крови. Борьба с ожирением (при его наличии) и сведение содержания жира в пище до минимума (30—50 *г* в сутки) позволяют с успехом лечить таких больных.

Другая болезнь этой группы характеризуется высоким содержанием холестерина и фосфолипидов в крови. Ее называют эссенциальной семейной гиперхолестеринемией. При этом часто развиваются ксантомы (содержащие холестерин) кожи и сухожилий и, что очень серьезно, обнаруживается склонность к быстрому развитию атеросклероза. Болезнь наследуется по аутосомно-доминантному типу. Ошибка обмена веществ заключается в механизме, регулирующем концентрацию холестерина в крови, но точная природа ее пока не выяснена.

Предложены различные виды лекарственного лечения (гормональные препараты, никотиновая кислота и др.), но все они сопряжены с нежелательными последствиями. Больным можно только рекомендовать умеренно питаться, избегать продуктов, богатых насыщенными жирными кислотами (сало, мясо, яйца), и заменять их растительными маслами с высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот (кукурузное, арахисовое масло).

Что касается наследственных липидозов второй группы, то их несколько.

Амавротическая («амаурос» — темный, слепой) идиотия, детская. Появляется обычно на первом году жизни. Характеризуется вялостью, апатией, нарастающим слабоумием, падением зрения до слепоты, мышечной слабостью, параличами; кончается гибелью к концу второго — началу третьего года. Характерный признак — вишнево-красное пятно в глазном дне. Наследственная болезнь аутосомно-рецессивного типа. Известно более 300 случаев, причем в большинстве случаев обнаружено кровное родство между родителями. Распространена в Северо-Восточной Европе. Поражается центральная нервная система.

Биохимическое «повреждение» состоит в дефекте фермента (какого именно, пока не установлено), участвующего в обмене ганглиозидов в клетках ганглиев. Ганглиозиды настолько заполняют клетки, что вызывают гибель последних. Характерной составной частью ганглиозидов является сиаловая (или нейраминовая) кислота, наряду с которой в них входят гексозы, жирная кислота, хондрозамин и сфингозин.

Известны «позднедетская» и юношеская формы этой болезни. Юношеская форма проявляется в 5—8 лет прогрессирующим ослаблением зрения и умственных способностей. Долголетняя болезнь ведет к слепоте, идиотизму и кончается смертью. Эта форма особенно распространена в Швеции, где частота ее определяется 1 : 40 000; генетически она может быть следствием другой мутации, чем детская форма.

В болезни Нимана — Пика липидоз обусловлен главным образом накоплением в ретикуло-эндотелиальной и других тканях сфингомиелина, содержание которого в печени и селезенке в десятки раз превышает нормальное. Очевидно, ошибка обмена затрагивает превращение сфингомиелина, но на каком именно участке — пока не выяснено. Болезнь, чаще встречающаяся у детей, родители которых состоят в кровном родстве, носит рецессивный характер. Всего известно около 100 случаев, главным образом в еврейских семьях [36]. Для лечения испробованы переливание крови, удаление селезенки, массивные дозы витамина А, кортизон, липотропные вещества и другое, но без заметного эффекта. Болезнь начинается на первом году жизни и кончается гибелью ребенка к 3 годам.

К этой же группе относится болезнь Гоше, при которой находят отложения цереброзидов в характерных, крупных клетках Гоше. Она протекает тяжело в детском возрасте, когда характеризуется разрушениями нервной системы, легче — у взрослых. В большинстве случаев наследуется по аутосомно-рецессивному типу, в литературе описано около 150 случаев [36], аномалия обмена находится в механизме, регулирующем отложение цереброзидов в клетках, однако точных сведений пока нет. Биохимически болезнь всегда сопровождается повышением активности сывороточной кислой фосфатазы (отличной от той, которая наблюдается при болезни предстательной железы), но причины этого не выяснены. Из методов лечения наибольший эффект дает удаление селезенки, в которой накапливаются цереброзиды. Боли успокаиваются после приема стероидных препаратов.

Известно менее 300 случаев другой наследственной болезни этой группы — гаргоилизма (от франц. «гаргуй» — рыльце водосточной трубы готических соборов, украшенных фигурами с уродливыми лицами). При этой болезни, главным образом аутосомно-рецессивной формы, явно нарушен обмен ганглиозидов и свободных мукополисахаридов, но место ошибки обмена пока не выяснено. Содержание этих веществ заметно повышено в мозге, селезенке, печени, лимфатических узлах. Внешний вид больных очень характерен. Лечение

симптоматическое, но гаргоилизм пока неизлечим. Комбинированное лечение облучением гипофиза и тиреоидином дает временное улучшение.

Аномалии пуринового и пиримидинового обмена

Подагра. Один из характерных признаков подагры — повышенное содержание мочевой кислоты, задержка выделения ее солей (уратов) с мочой и отложение уратов в хрящах, суставах, коже и в других тканях. Иногда общее количество отложенных уратов может исчисляться килограммами!

Один из характерных признаков подагры — «тофи». Так называются отложения уратов в виде узелков на мочках ушей и в завитках ушных раковин, а также вокруг суставов и сухожилий, что вызывает боли и ограничивает их подвижность.

Такая подагра развивается почти исключительно у пожилых мужчин. Очень часто поражаются почки, что может привести к гибели от болезней почек. При подагре содержание уратов в крови, в норме около 4 *мг* %, может повыситься в 2—4 раза, что, очевидно, обусловлено повышенным образованием уратов, а может быть, и пониженным выделением мочевой кислоты с мочой. Такое повышение часто наблюдается у родственников больных подагрой, да и подагрой они заболевают чаще других. Наследственное предрасположение к подагре почти не отмечается у женщин, что, кстати, очень затрудняет установление наследственного характера болезни. Место нарушения обмена, ведущего к повышению уровня уратов, пока не установлено. Подагру принято считать заболеванием аутосомно-доминантного типа, с неполным проявлением (около 20%) у мужчин и почти полным проявлением у женщин. Большое значение для профилактики и лечения больных подагрой имеет пищевой режим. Из лекарственных препаратов, вызывающих усиление выделения уратов и их растворение в суставах, приносят пользу салицилаты, фенилбутазон, сульфинпиразон, пробенецид, кортикостероиды. Но каждый лекарственный препарат обладает разносторонним действием и пользоваться ими можно только по предписанию врача.

Ксантинурия. Известен только один хорошо документированный случай этого редчайшего заболевания [36]. Как и мочевая кислота, химическим предшественником которой в организме он является, ксантин относится к пуринам. Можно допустить, что при ксантинурии имеется дефект фермента, окисляющего ксантин в мочевую кислоту. Возможно также, что имеется и дефект работы почек, вследствие чего ксантин так быстро выделяется с мочой, что не успевает окисляться в мочевую кислоту. В силу той или иной причины (или обеих причин вместе) больной выделяет большие количества ксантина и образуются ксантиновые камни. В литературе описано более 30 случаев обнаружения ксантиновых камней у людей различного возраста, преимущественно мужчин [36]. Наследственность этой болезни пока достоверно не доказана. Лечение сводится к усиленно-

му приему жидкостей, а также щелочей для установления щелочной реакции мочи. Интересно, что при ксантинурии резко понижается содержание мочевой кислоты в сыворотке крови и в моче. На одном из этапов обмена пуринов образуется оротовая кислота. В здоровом организме эта кислота при помощи фермента присоединяет фосфорную кислоту, а на следующем этапе подвергается воздействию фермента, отщепляющего от нее карбоксильную группу. При ошибке обмена веществ активность одного из этих ферментов нарушается, что приводит к выделению с мочой большого количества кристаллов оротовой кислоты и развитию тяжелой анемии. Болезнь была обнаружена у пятимесячного сына кровных родственников, у которых активность упомянутых ферментов оказалась пониженной (как, впрочем, у брата и сестры больного [36]).

Ребенка удалось вылечить гормонами коры надпочечников и введением смеси уридиловой и цитидиловой кислот, действующих на систему ферментов обмена оротовой кислоты. Он все же погиб от тяжелой формы ветряной оспы.

β-Аминоизобутиратацидурия сопровождается выделением с мочой (ежесуточно 200—300 *мг*) β-аминоизомасляной кислоты. Собственно говоря, эту кислоту нельзя отнести к группе аминокислот, составляющих молекулу белков, так как ее не смогли обнаружить ни в одном из изученных белков. Она может образоваться из пиримидинового основания (тимина) или из аминокислоты — валина.

Есть основания предполагать, что ферменты, участвующие в образовании бета-аминоизомасляной кислоты, не причастны к ее выделению с мочой; скорее здесь дефект ферментов, участвующих в ее дальнейших превращениях, которым обусловлена эта «болезнь» рецессивного типа. Слово «болезнь» взято в кавычки, потому что выделение этой кислоты — довольно широко наблюдающееся явление у здоровых людей. Правда, выделение бета-аминоизомасляной кислоты наблюдается в повышенных количествах при некоторых болезнях (лейкемия, туберкулез, болезни печени), но и здесь источники ее надо искать в повышенном распаде дезоксирибонуклеиновой кислоты.

Кроме того, тут возможны совпадения, поскольку больные и до болезни могли выделять бета-аминоизомасляную кислоту, что проходило незамеченным. Пол и диета не влияют на выделение этой кислоты. Дети до 5 лет чаще выделяют повышенные количества ее, чем взрослые; китайцы, японцы и таиландцы чаще, чем белое население США, Англии и Италии. Частота может превышать 10% (обследованных случаев).

Аномалии стероидного обмена. Природа врожденного нарушения функции коры надпочечников, носящего название адреногенитального синдрома, заключается в ошибке обмена веществ при биосинтезе стероидных гормонов. Характерной чертой является недостаточная способность к синтезу кортизона. На это сейчас же реагирует гипофиз, который возмещает это усиленным выделением в кровь адренокортикотропного гормона (АКТГ), в свою очередь действующего на кору надпочечников. Однако вместо увеличения образования

кортизона это приводит к повышению продукции половых гормонов андрогенов. Степень нарушения синтеза кортизона может быть различной, в зависимости от этого различны и клинические проявления. Чрезвычайная выработка мужских половых гормонов (андрогенов) приводит у женщин к псевдогермафродитизму, вирилизму, а у лиц мужского пола — к усилению вторичных половых признаков.

Что касается ошибки обмена веществ, то она выражается в наследственной недостаточности любого из четырех ферментов (дегидразы и трех разных гидроксидаз), участвующих в синтезе кортизона. Между выработкой кортизона в надпочечниках и продукцией АКТГ гипофизом существует обратная связь, поддерживающая очень подвижное равновесие. АКТГ способствует образованию кортизона, но кортизон тормозит образование АКТГ. Выпадение одного из ферментов, управляющих синтезом кортизона, нарушает это равновесие, направляет деятельность коры надпочечников по другому руслу использования предшественников кортизона для образования мужских половых гормонов, вызывающих маскулинизацию девочек и раннюю половую зрелость мальчиков. Эта ошибка обмена наследуется рецессивно.

Чем раньше начать лечение (например, с 1—2-летнего возраста), тем лучшие результаты оно дает. Лечить же лучше всего кортизоном. В некоторых случаях, при полной блокаде синтеза оксистероидных гормонов, расстраивается солевой обмен, а это серьезная угроза; необходимо срочно принимать меры (вливание физиологического раствора, сывороток, введение дезоксикортикостерон-ацетата). Болезнь сопровождается выделением с мочой большого количества андрогенных 17-кетостероидов.

Первое описание болезни было дано 150 лет назад. С тех пор в литературе описаны сотни случаев [36].

Аномалии обмена металлов

Гемохроматоз. Эта болезнь выражается в нарушении обмена железа.

Ферритин — белок, в молекуле которого может быть очень много связанного железа. Ферритином богаты селезенка, печень и слизистая оболочка кишечника. Гемосидерин по химическому составу близок к ферритину. Больше всего его в печени и легких. Наследственный гемохроматоз выражается в повышенном усвоении и отложении железа, главным образом в виде гемосидерина. Организм как бы забивает склады избытком железа. Количество гемосидерина при этом возрастает в десятки раз. Перенос железа плазмой крови при этом повышен, а трансферрин содержит трехвалентное железо в количествах, значительно превышающих норму.

Место ошибки обмена веществ при этом точно не установлено. Известно, однако, что баланс железа нарушается за счет того, что усвоение его ежесуточно на 2—4 *мг* превышает выделение из организма, что вредно для организма.

Отложение повышенных количеств гемосидерина в печени, сердце, железах внутренней секреции и других органах нарушает, иногда очень серьезно, их работу.

Для больных гемохроматозом обычны цирроз печени, сахарный диабет и синевато-коричневая пигментация кожи.

Болезнь носит аутосомно-рецессивный характер и встречается преимущественно у мужчин, так как организм женщины как бы защищается самолечением, теряя много железа при менструациях, во время беременности и при кормлении ребенка. Этот принцип лег в основу успешного лечения больных периодическим кровопусканием из вены для удаления излишков железа. Такие кровопускания делают еженедельно (выпуская каждый раз до 500 *мл* крови) на протяжении многих месяцев и даже лет, контролируя содержание железа в сыворотке крови и, когда оно заметно понизится, увеличивая промежутки между кровопусканиями. Подобное лечение приносит значительное облегчение и приостанавливает развитие болезни.

Гемохроматоз не относится к группе очень редких заболеваний. Во всяком случае, в литературе описано более 100 случаев.

Наследственная эпизодическая адинамия. Эта болезнь аутосомно-доминантного типа проявляется еще в раннем детстве приступами мышечной слабости — адинамии — или параличами отдельных групп мышц. Продолжительность приступов (чаще дневных, чем ночных) от 10 до 45 минут. В отличие от периодического паралича содержание калия в сыворотке крови во время приступа не понижено, тогда как уровень фосфора в ней и число эозинофилов понижены, как и при периодическом параличе. Потенциалы действия в мышцах укорочены. Повышается выделение калия с мочой.

Ошибка обмена, вероятно, лежит в нарушении регулирования выделения альдостерона и гидрокортизона надпочечными железами. Прямых доказательств этого пока нет. Однако косвенно это доказывается следующим обстоятельством. Все, что обычно стимулирует повышение выделения альдостерона надпочечниками (волнения, введение глюкозы, инсулина, обильная еда ночью) или является признаком повышения продукции надпочечниками гидрокортизона (снижение числа эозинофилов в крови) — в известной степени характерно и для приступов болезни. Есть предположение [36], что имеются нарушения и в обмене ацетилхолина, к которому больные проявляют повышенную чувствительность.

Лечение заключается в умеренном образе жизни, частом и регулярном приеме необильной пищи, а также в даче больным глюконата кальция, препаратов сухой щитовидной железы и рыбьего жира.

Аномалии в химии крови

В 1949 г. Полинг [7] обнаружил в эритроцитах больных особой формой анемии гемоглобин, молекула которого отличалась по электрофоретической подвижности от нормального гемоглобина. Так была вскрыта еще одна врожденная ошибка обмена веществ (образование

«уродливой» молекулы гемоглобина) и родился термин «молекулярная болезнь».

Собственно говоря, эта особая форма, так называемая серповидноклеточная анемия, уже давно (1910 г.) была известна как тяжелое врожденное заболевание. Заслуга Полинга в том, что он впервые наглядно показал зависимость этой болезни от образования ненормальных молекул гемоглобина. Но надо было еще выявить, в чем причина такой ненормальности. Это было сделано позднее путем тщательного изучения строения глобина. Глобин — белок со сравнительно небольшой для белка молекулой (мол. вес. 68 000). В нормальных видах гемоглобина глобин образуется из четырех пептидных цепей, каждая из которых содержит приблизительно по 140 аминокислот. Уродство молекулы гемоглобина S (от первой буквы английского термина «Sickle cell» серповидная клетка) заключается в замене только одной молекулы, а именно глютаминовой кислоты, валином. И такое нарушение нормальной последовательности аминокислотных звеньев в молекуле приводит к тяжелому заболеванию. Почему же это происходит?

Дело в том, что ненормальный гемоглобин в восстановленном виде в пятьдесят раз менее растворим, чем нормальный оксигемоглобин. Вследствие этого он легко кристаллизуется внутри эритроцита, и тем самым изменяет его форму. Такие эритроциты легко скучиваются и закупоривают мельчайшие кровеносные сосуды, а это приводит к инфаркту и другим тяжелым осложнениям: тромбозу, массовому гемолизу эритроцитов. Особенно тяжело протекает серповидноклеточная анемия у детей, оба родителя которых являются носителями ненормального гемоглобина.

Для обозначения гемоглобинов принято пользоваться буквами. Собственно говоря, и нормальных гемоглобинов несколько, так как у человека они образуются в различные стадии развития. Еще 100 лет назад было установлено,что кровь плода и кровь пуповины содержат особый гемоглобин, который гораздо легче насыщается кислородом, даже при недостатке последнего, а это помогает плоду приспосабливаться к среде, бедной кислородом. Этот гемоглобин обозначают буквой F («фетус» — плод). В крови взрослого человека резко преобладает нормальный гемоглобин А и содержится лишь небольшая примесь других гемоглобинов (разновидностей гемоглобина А и гемоглобина F) не более 10%. Но после открытия гемоглобина S с его уродливой молекулой за последние годы выявлено столько ненормальных гемоглобинов, что для обозначения их не хватает букв алфавита. Лучше других изучены гемоглобины A, S, C,G. Интересно, что ненормальность молекулы у этих гемоглобинов проявляется всегда в одном участке, а именно всегда происходит замена глютаминовой кислоты другими аминокислотами. Едва ли это случайность. Скорее можно предположить какую-то неустойчивость в том отрезке ДНК, который управляет синтезом этого участка.

Белковая часть нормального гемоглобина (глобин) состоит из четырех пептидных цепей, которые обозначаются как альфа (две

цепи), бета (одна цепь) и гамма (одна цепь). Каждая цепь содержит приблизительно по 140 аминокислот, расположенных в определенной последовательности. Инграм [36] сперва расщепил молекулу нормального и «больного» гемоглобина не на сотни аминокислот, а всего на 28 пептидов, которые при помощи электрофореза и хроматографии разделил на бумаге, окрасил специальной краской и получил, таким образом, «отпечатки пальцев» различных пептидов. Сравнивая эти отпечатки между собой, он нашел, что в одном из пептидов ненормального гемоглобина S глютаминовая кислота заменена валином.

Этот метод был применен и к другим гемоглобинам и дал блестящие результаты. Химическое строение всех известных в настоящее время 30 типов гемоглобина полностью не выяснено. Но ясно одно. Различие между ними обусловлено различиями в строении гемоглобина.

Как мы уже упоминали, нормальный гемоглобин А (от «адултус»— взрослый) состоит также из нескольких отличающихся один от другого гемоглобинов: A_1, A_2, A_3 и A_4. Количество гемоглобина A_2 у здоровых людей не превышает 3,5% от общего гемоглобина. При талассемии (от «таласса» — море) уровень именно этого гемоглобина повышается настолько, что позволяет врачу устанавливать характер заболевания. Это очень ценный признак, позволяющий обнаруживать легкие формы заболевания, у которого очень мало других проявлений болезни. Эту форму так и называют «талассемия минимальная». Наблюдается она у детей гетерозиготов. Такая легкая форма лечения не требует. Несколько выраженнее болезнь при талассемии у взрослых гетерозиготов, носящая название средиземноморской анемии взрослых. У этих больных (хотя и не всегда) можно наблюдать желтушность кожных покровов, истонченность костей. В крови небольшое количество характерных мишеневидных эритроцитов.

Тяжелым заболеванием является средиземноморская анемия детей (талассемия майор). Эта гомозиготная форма уже с первых месяцев жизни проявляется в виде неуклонно увеличивающейся анемии. Характерны резкое увеличение печени и селезенки, бледность и желтушность кожных покровов, истончение и разрушение костей, шум в сердце, монголоидные черты лица, недоразвитость, резкие изменения в картине крови и смертельный исход не позднее чем к 10 годам со дня рождения. Радикальных способов лечения пока не найдено. При средних формах талассемии удаление селезенки иногда дает благоприятный эффект.

В чем причина возникновения молекулярных аномалий гемоглобина?

Известно, что такие «гемоглобинопатии» распространены в малярийном поясе по берегам Средиземного моря (отсюда и название средиземноморская), в Африке, Индии. Были изучены молекулярные аномалии гемоглобина крови человека. Гемоглобин является главным питательным веществом для возбудителя малярии. Малярийный паразит может питаться только высококачественным, нормальным гемо-

глобином. Едва заметное изменение в чередовании аминокислот гемоглобина — и особый фермент малярийного плазмодия прекращает свою деятельность. Создается впечатление, что этот фермент может атаковать молекулу гемоглобина только через участок глютаминовой кислоты.

Дело тут не в том, что малярийный возбудитель погибает от недостатка избранной им пищи: нормального гемоглобина. Мы знаем, что хотя болезнь передается по наследству, но у детей гетерозиготов почти три четверти всего запаса гемоглобина остается совершенно неизмененной — с нормальными молекулами. Изменению подвергается только ничтожная часть (1/700) аминокислот гемоглобиновых молекул эритроцита. В физиологических условиях содержание нормального гемоглобина в крови здорового человека колеблется в гораздо более широких пределах, но это не мешает ему служить пищей возбудителю малярии. В чем же тут дело? Можно предположить, что та мутация, которая создает уродливую молекулу гемоглобина, затрагивает аминокислоту, далеко не безразличную для малярийного плазмодия. Небезразличной она будет в том случае, если строго соответствует активному центру фермента паразита. Замена такой аминокислоты делает всю молекулу недоступной для фермента, защищает гемоглобин, а с ним вместе и жизнь его носителей. И это защитное приспособление в конечном счете спасало от малярии неисчислимые миллионы людей, губя своей оборотной стороной (анемией) миллион детей в каждом поколении. Несмотря на сложность молекулы гемоглобина, она легко распадается. Так, при кислой реакции нормальный гемоглобин А распадается на две половинки, которые при подкислении снова соединяются в гемоглобин. Такое воссоздание молекулы гемоглобина из его половинок и четвертушек носит название рекомбинации. Методы рекомбинации сыграли большую роль в изучении ненормальных гемоглобинов.

Как известно, гемоглобин можно называть восстановленным гемоглобином, так как он не содержит кислорода и, только соединяясь с кислородом, образует оксигемоглобин, очень нестойкое соединение. Но если двухвалентное железо гемоглобина окислить в трехвалентное, то возникает метгемоглобин, который уже не способен больше связывать кислород и поэтому выключается из его транспорта. В организме имеется система ферментов, восстанавливающих постоянно образующиеся небольшие количества метгемоглобина, что не дает этому последнему накопиться в количествах, превышающих 2%. Главную роль здесь играет метгемоглобин-редуктаза, которая восстанавливает метгемоглобин в гемоглобин и тем самым возвращает его в строй переносчиков кислорода.

Именно в активности метгемоглобинредуктазы сказывается наследственно передаваемая ошибка обмена веществ. Фермент не успевает переводить весь образующийся (и в лучшем случае бесполезный) метгемоглобин в гемоглобин. В результате нарушается равновесие между процессами окисления гемоглобина в метгемоглобин и процессами восстановления гемоглобина. Если дело не заходит

слишком далеко и накопление метгемоглобина не слишком велико, организм может справиться с этим. Но, когда содержание метгемоглобина превышает определенный уровень (а в некоторых случаях оно может составить более половины всего количества гемоглобина), организм может задохнуться. Доминантно наследующаяся метгемоглобинемия характеризуется наличием в крови не только нормального гемоглобина А, но и аномальных молекул гемоглобина М. Возможно, что под влиянием мутантного гена в белковой части этого гемоглобина образуется такая группа атомов, которая соединяется с трехвалентным железом.

Наследственная метгемоглобинемия еще в раннем детстве обнаруживается общей синюшностью (цианозом); кровь окрашена в бурый цвет, так как содержит повышенные количества метгемоглобина. Синюшность можно с успехом лечить введением метиленовой сини или аскорбиновой кислоты.

Метгемоглобинемия может быть и не наследственного характера. Она может развиться при некоторых инфекционных болезнях, а также иногда при эклампсии беременных. Чаще всего не наследственная метгемоглобинемия вызывается отравлением различными веществами (бертолетовой солью, нитритами, анилином и др.). Но между метгемоглобинемией, вызванной отравляющими веществами, и наследственной метгемоглобинемией, имеется существенное различие. Если в первом случае оставить кровь больного стоять, то метгемоглобин постепенно исчезает. При наследственной болезни этого самопроизвольного восстановления метгемоглобина не происходит. Следовательно, нарушение в случае врожденной метгемоглобинемии не обусловлено ненормальностью процессов окисления, а вызывается нарушением или отсутствием процессов ферментативного восстановления. Это было установлено исследованиями Гибсона, который сначала показал [3], что в здоровом организме возвращение метгемоглобина в строй переносчиков кислорода тесно связано с тем этапом распада глюкозы, в котором принимают активное участие переносчик водорода НАД и метгемоглобинредуктаза. Гибсон проследил шаг за шагом те же процессы в крови пяти сестер, больных врожденной метгемоглобинемией. Оказалось, что распад глюкозы (гликолиз) и переносчик водорода НАД функционируют нормально, а ошибка метаболизма проявляется в отсутствие или недостаточной активности метгемоглобинредуктазы.

Одновременная болезнь близких родственников (сестер) при полном благополучии родителей указывает, что болезнь носит рецессивно-наследственный характер.

Наследственная метгемоглобинемия — редкое заболевание. В настоящее время известно немногим более 100 случаев. Для лечения метгемоглобинемии применяют метиленовую синь и аскорбиновую кислоту.

Метиленовая синь и раньше с успехом применялась при лечении метгемоглобинемии, вызванной отравляющими веществами. Прием метиленовой сини в терапевтических дозах 1—2 *мг* на 1 *кг* веса тела

ведет за короткое время к полной ликвидации метгемоглобина. Очевидно, благоприятное действие метиленовой сини заключается в том, что она как бы открывает другой путь превращений, привлекая к участию в восстановлении метгемоглобина не НАД, а другой переносчик водорода (НАДФ).

Что касается аскорбиновой кислоты, то ее действие проявляется в непосредственном восстановлении метгемоглобина. Аскорбиновую кислоту необходимо применять в больших дозах; действие ее сказывается намного позднее, чем метиленовой сини, и хотя она резко уменьшает содержание метгемоглобина, но не устраняет его полностью и только способствует установлению равновесия при концентрации метгемоглобина на уровне 1%.

В незрелых красных кровяных клетках, как известно, первой реакцией синтеза гема является взаимодействие глицина с янтарной кислотой, после чего открывается цикл химических превращений. Уже в начале его образуется дельта-аминолевулиновая кислота, часть которой «выбывает» из этого цикла и идет на построение гема. Для этого две молекулы кислоты соединяются в одно целое, образуя из четырех пиррольных ядер уропорфириногенин. Из него образуются другие порфириногены: копропорфириноген и протопорфириноген. Каждый из них, меняя характер мостиков, соединяющих пиррольные ядра, может превратиться в соответствующие порфирины: уропорфирин, копропорфирин и протопорфирин. Из протопорфирина в молодых эритроцитах путем включения железа (при непременном участии витамина B_{12}, меди и тетрагидрофолиевой кислоты) синтезируется гем, который вместе с глобином образует гемоглобин.

Порфиринов существует очень много. Все они содержат один и тот же скелет из четырех пиррольных ядер, но отличаются характером боковых групп. В организме человека встречаются только следующие порфирины: копропорфирины I и III, уропорфирины I и III, дейтеропорфирин IX, протопорфирин IX, мезопорфирин IX.

Все пути синтеза протопорфирина и образования гема являются ферментативными реакциями. И именно на этих путях совершаются ошибки, лежащие в основе молекулярных болезней порфиринового обмена.

В чем проявляются эти болезни?

Врожденная эритропоэтическая (фотосенсибилизирующая) порфирия, характеризующаяся чрезмерным выделением одного или нескольких порфиринов в моче. Это тяжелое заболевание, наследующееся аутосомно-рецессивно, проявляется вскоре после рождения выделением красной мочи, содержащей большое количество уропорфирина. Уже в первый год после рождения под влиянием солнечных лучей на открытых участках тела появляются плохо заживающие пузыри и язвы. Селезенка резко увеличивается. Развивается анемия, сопровождающаяся распадом (гемолизом) эритроцитов. Болезнь встречается редко. В литературе описано менее 50 случаев в различных странах. Интересно, что эта болезнь встречается и у крупного рогатого скота.

Здоровый человек выделяет с суточной мочой не более 30 *мкг* уропорфирина и 300 *мкг* копропорфирина. У детей, больных порфиринурией, выделение уропорфирина с мочой может увеличиться в 1000 раз, а копропорфирина — в 15 раз. Резко повышается и выделение копропорфирина с калом. Параллельно повышается и уровень этих порфиринов в плазме и эритроцитах крови. В тех случаях, когда болезнь сопровождается повышенным распадом (гемолизом) эритроцитов, повышается выделение с калом уробилиногена, являющегося продуктом распада протопорфирина. Место ошибки обмена веществ в молекулярных основах этой болезни пока еще не определено точно. Вероятен дефект ферментов, участвующих в превращении порфобилиногена в уропорфириноген.

Другая форма нарушения порфиринового обмена носит название шведской перемежающейся острой порфирии. Она наследуется аутосомно-доминантно и проявляется к периоду половой зрелости в виде поражения печени, а также желудочными болями и нервными расстройствами. В моче выделяются большие количества порфобилиногена и дельта-аминолевулиновой кислоты. Приступы болезни чередуются с промежутками, когда нет никаких признаков заболевания. Колики в животе носят настолько тяжелый характер, что напоминают такие болезни, как прободение при язве желудка или воспаление поджелудочной железы. Нервные расстройства выражаются в болях, слабости, затруднениях при глотании, отрыжке. Эта форма порфирии встречается гораздо чаще предыдущей. Около 200 случаев обнаружено только в США, а в Швеции, несмотря на значительно меньшую численность населения, почти столько же, особенно в Лапландии, где на 100 человек населения встречается один больной.

Мы уже упоминали, что для шведской формы порфирии характерно выделение больших количеств порфобилиногена и дельта-аминолевулиновой кислоты с мочой. В суточной моче здорового человека содержится менее 2 *мг* обоих этих веществ. Больные во время приступа могут выделять в 100 раз большие количества. Менее характерно увеличение выделения порфиринов, которое также наблюдается при этой форме болезни.

Где происходит ошибка обмена веществ в данном случае? Выделение больших количеств дельта-аминолевулиновой кислоты и порфобилиногена указывает, что блокирование обменных превращений должно происходить где-то после образования этих химических предшественников порфиринов. Если дать здоровому человеку проглотить дельта-аминолевулиновую кислоту, выделение этого вещества или порфобилиногена не увеличивается. Очевидно, здоровый организм сохраняет способность превращать эти вещества в порфирины и гемоглобин. Но дача дельта-аминолевулиновой кислоты больному шведской формой порфирии влечет за собой выделение повышенных количеств порфобилиногена с мочой. Очевидно, выпадает действие ферментов, осуществляющих дальнейшие превращения этих веществ.

Шведская порфирия может, и довольно часто, как бы притаиться и притом на всю жизнь. Такая латентная форма болезни встречается у родственников (особенно у детей и племянников) больных с открытой острой порфирией. Болезнь не проявляется клинически болями, нервными расстройствами или повышенной чувствительностью к свету. Единственный признак — выделение больших количеств дельта-аминолевулиновой кислоты, порфобилиногена и порфиринов, иногда на протяжении многих десятков лет.

Интересно, что нередко встречаются такие скрытые формы порфирии, которые проявляются только после приема различных лекарств, в первую очередь барбитуратов и сульфамидных препаратов.

Наконец, существуют смешанные формы порфирии, при которых под влиянием солнечных лучей на коже появляются пузыри. Возможно, что это происходит вследствие ускорения окисления светом клеточных белков кожи. Известно также, что свет, особенно его ультрафиолетовая часть, способствует быстрому превращению предшественников, например уропорфириногена, в уропорфирин. Возможно, что это происходит в поверхностных капиллярах кожи. При смешанных формах порфирии такие кожные проявления сочетаются с накоплением копропорфирина и протопорфирина в печени, повышенным выделением их с калом и приступами желудочных болей. Наследственный (аутосомно-доминантный) тип этой болезни хорошо прослежен на шести поколениях (с 1814 г. до наших дней) буров в Южной Африке. Весьма вероятно, что болезнь эта ведет начало от одной супружеской пары голландцев, которые поженились в Южной Африке в 1688 г. и дали огромное потомство. Достаточно сказать, что за последние 150 лет только один из потомков дал к настоящему времени около 500 потомков. Этой форме дают также название «поздней кожной порфирии».

В последние годы обращено внимание на то, что у больных порфирией часто обнаруживается сахарная болезнь. Возможно, что порфирия предрасполагает к развитию сахарной болезни, однако это еще нуждается в подтверждении, поскольку биохимическая связь между ними не обнаружена. Преобладающая часть порфиринов попадает в организм с пищей, а отсюда переходит в печень, которая превращает их в копропорфирины. Порфирию можно искусственно воспроизвести у животных введением различных веществ (барбитуратов и др.), и это помогло изучить закономерности наследования нарушений порфиринового обмена. Разработаны широко доступные методы определения порфиринов, что облегчает диагностирование болезни.

Аномалии при биосинтезе эритроцитов

Гемолитическая анемия обусловливается повышенным распадом эритроцитов. Она может быть врожденной или благоприобретенной. Мы остановимся на врожденной форме, в основе которой лежит ошибка обмена веществ. Этой болезнью страдают десятки миллионов

людей от Тихого океана до Атлантики, в тропиках и субтропиках Старого Света. Болезнь выражается желтухой, малокровием, увеличением селезенки и печени (не всегда). Иногда болезнь носит доброкачественный характер и больные, по меткому выражению Видаля, «больше желтушны, чем больны». Но в ряде случаев могут возникать приступы желчной колики, язвы на голени, кровотечения. Кроме того, иногда развитие детей задерживается, череп, нос, уши принимают неправильную форму.

В основе указанных явлений лежит повышенный распад эритроцитов. Выходящий из них гемоглобин разрушается главным образом в печени, однако распад его может происходить во всех других органах, где свободный гемоглобин выходит за пределы кровеносной системы. Сначала разрывается связь между порфириновыми кольцами в молекуле гемоглобина и образуется пигмент зеленого цвета— вердоглобин. Затем из порфирина возникает (в основном в печени) соединение зеленого цвета — билирубин; у больных этот пигмент поступает в кровь в повышенных количествах. В еще больших количествах билирубин поступает в кишечник, где из него образуется сначала бесцветный уробилиноген, а затем желто-коричневый уробилин. Здоровый организм справляется с тем количеством уробилина, которое всасывается из кишечника в кровь, а оттуда переходит в мочу. Но организм больного гемолитической желтухой наводняется таким притоком уробилина, что он накапливается в крови (уробилинемия) и отсюда поступает в больших количествах в мочу (уробилинурия). И кал окрашивается в темно-коричневый цвет из-за «перегрузки» уробилином, что характеризует повышенный распад эритроцитов. Этот распад происходит главным образом в селезенке, что ведет к ее увеличению. И на долю печени приходится перегрузка, увеличивается количество билирубина, который, кроме того, способствует образованию камней в желчном пузыре. Такова картина этой болезни. Часто таким больным ставят диагноз: гепатит (воспаление печени), холецистит (воспаление желчного пузыря), цирроз печени. Это ошибка. Несмотря на некоторое увеличение печени, она работает нормально, больные не страдают отсутствием аппетита или желудочно-кишечными расстройствами. Самочувствие их обычно не ухудшается. Такое относительное благополучие характерно для врожденной гемолитической анемии, тогда как приобретенная (вследствие инфекций, охлаждения, приема некоторых лекарственных веществ и ядов) протекает гораздо острее и болезненнее. Чем объяснить нестойкость эритроцитов при этой болезни? В чем лежит ошибка обмена веществ? В эритроцитах восстановление окисленного глютатиона катализирует глютатионредуктаза, при непременном участии НАДФ-H_2. Без вмешательства этого вещества окисленный глютатион не может присоединить атомы водорода, т. е. восстановиться. На первом этапе превращений глюкозы в эритроците происходит его окисление (вернее, окисление глюкозо-6-фосфата) в 6-фосфоглюконовую кислоту при участии глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, присутствие которой в эритроцитах было открыто более 90

лет назад. Коферментом глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы является НАДФ-H_2. Без восстановленной формы глютатиона эритроцит обойтись не может и гибнет, что и происходит в отсутствие глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы или при резком снижении активности этого фермента. Наследственный дефект фермента обнаруживается только в стареющих эритроцитах и тромбоцитах. Очевидно, действие мутации сводится к понижению устойчивости фермента. Интересно, что организм стремится как бы компенсировать эту ошибку обмена веществ усиленной выработкой глютатионредуктазы, так как в эритроцитах больных гемолитической анемией всегда наблюдается повышенная активность этого фермента.

Наследственный дефект, очевидно, заключается не в изменении строения самой молекулы фермента. Это было показано специальными исследованиями, в которых фермент выделили из эритроцитов здоровых людей и больных гемолитической анемией. Сравнение показало, что ферменты из этих источников ничем не отличаются друг от друга. Остается предположить, что ошибка обмена веществ в этом случае заключается в отсутствие в «больных» эритроцитах активатора, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Результаты некоторых исследований [6] подтверждают это. Такая же гемолитическая болезнь, сопровождающаяся рвотой, лихорадкой, головокружением, желтухой и гемоглобинурией, особенно резко выраженная у мужчин, наблюдается после поедания конских бобов, особенно сырых. Эту непереносимость к употреблению в пищу конских бобов Vicia fava называют фавизмом. В Ираке фавизм носит название багдадской весенней анемии. Механизм развития гемолитической болезни при фавизме, а также после принятия некоторых противомалярийных препаратов (примахин), сульфаниламидов, фенацетина, ацетанилина и других имеет своей исходной точкой такой же наследственный дефект, наследуемый по доминантному типу. Эта наследственная ошибка обмена веществ обусловливает пониженную активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в стареющих эритроцитах.

После того как была выяснена химическая природа болезни, ученые обратили внимание, что она особенно распространена в малярийном поясе Средиземноморья. Оказалось, что обладатели гена пониженной активности 6-фосфатдегидрогеназы значительно меньше заражаются плазмодием малярии — мешает наследственный дефект в биохимии эритроцитов. Было установлено, что возбудители малярии особенно нуждаются в больших количествах восстановленного глютатиона. Но его-то как раз и нет в эритроцитах больных. Таким образом, на протяжении веков наследственно передается мутация, безусловно вредная для организма человека, но этой ценой завоевывается устойчивость к еще большему врагу — малярии. С эволюционной точки зрения, мутационные изменения, ведущие к образованию молекул, недоступных малярийному плазмодию, несомненно прогрессивны. Мутации, ведущие к появлению многих форм гемоглобиновой молекулы или изменяющие биохимию эритроцита, как в случае с наследственным дефектом глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы,

ведут к наследственному полиморфизму. Этот полиморфизм называют балансированным, когда гетерозиготная форма более жизнеспособна, чем обе гомозиготные формы, благодаря чему сотни миллионов людей выстояли перед натиском плазмодия в малярийном поясе.

Для лечения наследственной гемолитической анемии применяют гормональные препараты (преднизолон и др.) в течение длительного времени, хотя такое лечение более эффективно в случаях приобретенной болезни. Лучшие результаты дает хирургическое лечение — удаление селезенки, к которому прибегают, если обычное лечение (гигиенический режим, отдых, витамины, общеукрепляющие средства) не дает результатов.

Семейный характер носит и очень близкая к врожденной гемолитической анемии так называемая овально-клеточная анемия, при которой в крови обнаруживают эритроциты эллипсоидной формы (лептоциты), селезенка увеличена и налицо гемолитическая желтуха.

Нарушения свертываемости крови

Свертывание крови — это сложный процесс, протекающий пофазно.

I *фаза*: выделение из кровяных пластинок (один из видов клеток крови), обладающих способностью склеиваться друг с другом и образовывать тромб, тромбопластин (от греческих слов «тромб» — ком или сгусток и «пластин» — создаю, образую). Если в силу каких-либо болезненных причин усиливается способность кровяных пластинок склеиваться, в кровяном русле могут образоваться сгустки, так называемые тромбы.

II *фаза*: превращение протромбина (всегда присутствующее в крови белковое вещество) под воздействием выделившегося тромбопластина в активный фермент тромбин.

III *фаза*: превращение растворенного в крови белка фибриногена в нерастворимый фибрин под влиянием тромбина. Из нитей и сгустков фибрина создается основа тромба, закупоривающего сосуд.

В крови, как правило, готового тромбина нет. У здорового человека в ответ на появление небольших количеств тромбина сразу начинается защитная реакция. При помощи специального рефлекса организм защищает себя от тромбина — в кровь поступают противосвертывающие вещества (гепарин и др.). Больше всего гепарина (от греческого слова «гепар» — печень) в тканях печени и легких.

Пока в организме сохраняется противосвертывающий рефлекс, небольшие количества тромбина не вызывают свертывания крови.

При атеросклерозе, характеризующемся, как известно, изменением стенок сосудов, чувствительность к тромбину нередко снижена.

Вследствие этого защитный рефлекс не возникает. Противосвертывающие вещества не выделяются, возможность образования тромбов увеличивается.

Перейдем теперь к наследственным болезням свертывания крови. Их немало, но мы остановимся только на тех, молекулярные основы которых более или менее выяснены.

Болезни, связанные со свертыванием крови, вызываются наследственным дефектом во многих случаях. Известно редчайшее заболевание, очевидно рецессивного типа, связанное с недостатком протромбина. В литературе указаны [3б] всего три случая, в том числе у двух братьев. Оба брата показали удлиненное протромбиновое время, которое у одного из них удалось сократить дачей витамина K. Описаны десятки случаев другого наследственного заболевания — врожденного, полного или относительного недостатка фактора V. В ряде случаев родители больных детей были кровными родственниками. Это заболевание встречается среди обоих полов. У девушек и женщин оно служит причиной обильных месячных кровотечений, ведущих к анемии. Хотя царапины и уколы у таких больных обычно не кровоточат, но вообще они отличаются сильной кровоточивостью при ранениях.

Известно, что недостаток фактора VII тоже является причиной наследственного заболевания аутосомно-рецессивного типа, причем у гомозиготов проявляется тяжелой кровоточивостью, а у гетерозиготов очень слабо. Известно менее 10 случаев этого заболевания. Ошибка обмена, очевидно, заключается в так называемой бета-глобулиновой фракции белков сыворотки крови, поскольку фактор VII относится именно к этим белкам.

Не так давно было обнаружено аутосомно-рецессивное заболевание, связанное с недостатком фактора Стюарта. Характерен случай с мужем и женой — кровными родственниками, которые имели 12 детей; из них 6 были практически здоровыми, а 6 отличались повышенной (но не катастрофически) кровоточивостью [3б].

Наиболее распространенным и хорошо известным заболеванием этой группы является гемофилия А.

Место нарушения обмена в этом наследственном заболевании точно не установлено. Принято считать, что у гемофиликов недостаточность антигемофилического глобулина. Возможно также, что определенную роль играет здесь дефект вещества, оказывающего подавляющее (ингибирующее) действие на свертывание. Болезнь обнаруживается в раннем детстве. Характеризуется сильной кровоточивостью, частыми кровоизлияниями в суставы, тяжелыми кровотечениями после ничтожных травм. Заболевание в основном затрагивает мальчиков. Характерна фазовость в устойчивости и восприимчивости к травмам. Кровотечение наступает не сразу после травмы. Средняя продолжительность жизни людей, страдающих этой болезнью, от 16 до 22 лет.

В гемофилии В (болезнь Кристмаса), похожей на это заболевание, место ошибки обмена заключается в недостатке фактора IX, содер-

жание которого в крови снижено в 15—40 раз против нормы. Эта врожденная болезнь (наследование, связанное с полом [1]) хорошо была изучена на 11 поколениях одной швейцарской семьи, в которой нашли 55 больных гемофилией на 3072 члена семьи. Средняя продолжительность жизни больного 22 года. Различить гемофилию А от гемофилии В можно по тому, что смесь равных частей крови больных этими болезнями свертывается нормально, а в отдельности ненормально.

Умеренной кровоточивостью отличается наследственная болезнь аутосомно-рецессивного типа, обозначаемая как дефект предшественника тромбопластина плазмы крови. Отличается удлиненным временем свертывания и ненормальным поглощением протромбина. Иногда кровоточивость принимает серьезные масштабы. Болезнь распространена неравномерно; например, сравнительно часта в Нью-Йорке, очень редка в Лондоне.

«Разновидность» этого заболевания обнаружили у некоего Хагемана и так и назвали «дефект фактора Хагемана» [3б]. Носители дефекта—клинически здоровые люди, только при лабораторном исследовании кровь их отличается удлиненным временем свертывания и ненормальным поглощением протромбина.

Собственно говоря, оба эти заболевания отличаются особым поведением крови в лаборатории. Обычно при контакте с поверхностью стекла (стеклянной посуды) кровь свертывается, а при указанных заболеваниях — не свертывается (не прилипает к поверхности стекла).

Считается, что дефект Хагемана — болезнь аутосомно-рецессивного типа.

Умеренной тяжестью (хотя у женщин могут быть тяжелые кровотечения при менструации) отличается сосудистая гемофилия, впервые описанная Виллебрандом и носящая его имя [3б]. В ней сочетается недостаток антигемофильного глобулина с дефектом капилляров. Болезнь наследуется по аутосомно-доминантному типу.

Некоторые из упомянутых дефектов свертывания крови могут сочетаться у одного и того же больного.

Среди белков плазмы широко известны гамма-глобулины, защищающие наш организм от инфекций. Наследственно передаваемая недостаточность гамма-глобулинов ведет к предрасположению к инфекционным болезням. Такие люди легко по нескольку раз болеют свинкой или другими детскими болезнями, которыми нормальные люди повторно обычно уже не болеют. Подобная несопротивляемость некоторым болезням объясняется тем, что к гамма-глобулинам относятся антитела, играющие важную роль в защите нашего тела от «чужеземного» нашествия. Открытие этого вида «ошибки» белкового синтеза навело на мысль: нельзя ли использовать это явление в

---

[1] Наследственный дефект, передающийся связанным с полом, в генетике называют сцепленным с полом [6].

тех случаях, когда человеку необходимо пересадить кусочки «чужих» тканей? Известно, что главным препятствием к трансплантации служит несовместимость чужих тканей (другими словами — чужого белка) с тканями нашего тела. Организм борется против внедрения чужого белка усиленной выработкой антител (гамма-глобулинов). Можно ли сделать попытку перед трансплантацией временно (и притом обратимо) подавить производство гамма-глобулинов, заставить клетки нашего тела «умышленно» сделать ошибку в синтезе этих белков? Поиски в этом направлении ведутся. Заметим, что есть случаи, когда недостаток гамма-глобулинов является не наследственным, но благоприобретенным, как результат какой-либо инфекционной болезни.

Очень редко встречается еще одна ошибка белкового синтеза, следствием которой является отсутствие фибриногена.

Акаталазия

Как известно, фермент каталаза осуществляет распад перекиси водорода на воду и молекулярный кислород. В организме перекиси образуются в процессах окисления. Так как перекись ядовита для клеток, каталаза играет защитную роль, предохраняя организм от этого действия перекиси.

Каталаза широко распространена в организме. Этим ферментом особенно богаты эритроциты и печень.

Двадцать лет назад японский ларинголог Такахара обнаружил, что кровь оперированного им пациента при прибавлении капли перекиси водорода немедленно потемнела без газообразования [8]. А ведь после добавления капли перекиси к крови здорового человека сейчас же образуется газ, но окраска крови не меняется. Оказалось, что кровь оперированной женщины (и нескольких членов ее семейства) не содержала каталазы. Позднейшие исследования показали, что гипокаталаземия широко распространена в Японии (в других странах пока не обнаружена); частота ее составляет приблизительно 1 случай на 1000 человек.

Как известно, в Японии совершаются браки между кровными родственниками. Не удивительно поэтому, что акаталазия, наследуемая аутосомно-рецессивно, распространена в этой стране, причем у гетерозиготов обнаруживается пониженная активность каталазы крови (гипокаталаземия).

Болезнь очень часто ничем не проявляется. Однако заболевания полости рта протекают, когда они возникают, очень тяжело — с гангреной, выпадением зубов и поражением челюстей. Вероятнее всего, при заболеваниях полости рта бактерии, населяющие ее в больших количествах, вырабатывают перекись водорода, которая разрушает ткани. Возможно, что перекись водорода разрушает структурные и ферментные белки полости рта, окисляя их сульфгидрильные (серусодержащие) группы. «Ошибка» обмена, выражающая-

ся в нарушении синтеза каталазы, наблюдается также у некоторых пород собак и морских свинок.

Необходима строгая профилактика полости рта. Лечение гангренозного воспаления десен ведут при помощи антибиотиков, удаления зубов и оперативного вмешательства. Неплохие результаты дает переливание цельной крови, содержащей каталазу.

Гипофосфатазия

К фосфатазам относят ферменты, отщепляющие фосфорную кислоту из ее соединений с органическими веществами. Известно около двух десятков различных фосфатаз. Нас интересует здесь щелочная костная фосфатаза, которая, освобождая фосфорную кислоту из ее органических соединений (с глюкозой), способствует отложению в костной ткани фосфата кальция. Главной, но не единственной чертой гипофосфатазий является пониженная активность щелочной фосфатазы. Удобнее всего определять активность этого фермента в сыворотке крови, но в ряде случаев удалось показать, что она сильно понижена и в костях, хрящах, зубах, печени, почках. Это является характерным проявлением ошибки обмена веществ при гипофосфатазии. Имеются и другие дефекты, в частности появление фосфоэтаноламина в моче, а нередко и повышение содержания кальция в крови. Эти биохимические нарушения сочетаются с серьезными костными изменениями рахитического типа, обусловленными дефектами костеобразования. Болезнь можно обнаружить как в детском возрасте, так и у взрослых.

Фосфоэтаноламин не является составной частью мочи здоровых людей (это нормальная составная часть мозга). Но при некоторых заболеваниях он все же может появиться в моче (например, при болезнях печени).

Как объяснить появление фосфоэтаноламина в моче при гипофосфатазии? Возможно, что это основной субстрат для костной щелочной фосфатазы. И наследственное блокирование реакции отщепления фосфорной кислоты от этого соединения служит причиной появления «неиспользованного» фосфоэтаноламина в моче. Это предположение нуждается еще в доказательствах. Возможно, что фосфоэтаноламин играет роль в оссификации костей. Но и это только предположение. Ясно во всяком случае, что щелочная фосфатаза необходима для нормального костеобразования.

Хотя для лечения больных были предложены витамин Д и кортизон, но так как результаты оказались противоречивыми, эти методы лечения нельзя считать разработанными. Болезнь наследуется по аутосомно-рецессивному типу. В литературе описано несколько десятков случаев.

В последнее время некоторые ученые считают, что ошибка обмена веществ при гипофосфатазии затрагивает целый ряд ферментных систем, и особенно хондроитинсерную кислоту, которая играет важную роль в самом начале костеобразования.

Ошибки обмена веществ, влияющие на функции почечных канальцев, лежат в основе нескольких наследственных болезней.

В литературе описаны сотни случаев рахита, устойчивого к лечению витамином Д и характеризующегося низким содержанием фосфора в крови. Ошибка обмена при этом заключается в пониженной реабсорбции (обратном всасывании) неорганического фосфата в почечных канальцах. Нарушение обмена фосфора влечет за собой появление признаков рахита (дугообразное искривление ног и др.). Лечат большими дозами витамина Д (дозу увеличивают, доводя ее с 25 000 до 250 000 единиц в день) под тщательным контролем уровня фосфора, кальция и щелочной фосфатазы в сыворотке крови. Успех лечения зависит от ранней диагностики. Болезнь носит название семейной гипофосфатаземии.

В 1931 г. Фанкони описал ребенка, у которого рахит сочетался с альбуминурией и глюкозурией. В дальнейшем этот список пополнился аминоацидурией и гиперфосфатурией, и «все вместе», в сочетании с рахитом (остеомаляцией), получило название синдрома Фанкони. Болезнь аутосомно-рецессивного типа. Может проявиться уже с 4-месячного возраста, поскольку радикальных средств устранения дефекта в почках пока не имеется [36].

Витамин Д, метилтестостерон и впрыскивания гамма-глобулина дают только временное улучшение.

Поздней форме у взрослых помогает непрерывная и пожизненная дача очень больших доз витамина Д, больших количеств фосфата в пище и введение раствора Шоля, содержащего 14% лимонной кислоты и 9,8% цитрата натрия. Частота распространения в Англии — 2,2 на 100 тысяч.

Сходное по одному признаку — глюкозурии — заболевание состоит в веделении глюкозы с мочой без повышения уровня глюкозы в крови (гипергликемии). При этом наследственном заболевании доминантного типа место ошибки обмена заключается в почках. Заболевание это носит безобидный характер за исключением состояний беременности и голодания, когда может привести к излишней потере воды (дегидратации) и появлению кетоновых тел. Его называют почечной глюкозурией. Относительно частоты имеются разногласия. По некоторым данным, она составляет 84 на 40 000 случаев обычной глюкозурии.

Очень редко встречается другое наследственное заболевание, при котором ошибка обмена лежит в неспособности почечных канальцев поддерживать концентрацию водородных ионов, достаточную для сохранения буферности. Возникает состояние ацидоза, сопровождающееся потерей кальция и калия, вследствие чего развивается рахит и повреждаются почки, а также возникает дряблость мышц. Необходимо вводить с пищей достаточное количество буфера, чтобы предупредить развитие этих осложнений. Болезнь часто бывает благоприобретенной.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Вагнер Р.* и *Митчелл Г.* Генетика и обмен веществ. М., 1958.
2. *Ниль Дж.* и *Шалл У.* Наследственность человека. М., 1958.
3. *Асатиани В. С.* Молекулярные основы патологии. Изд-во «Знание», 1966.
3а. *Прокофьева-Бельговская А. А.* В кн. «Актуальные вопросы современной генетики». М., Изд-во МГУ, 1966, стр. 23.
3б. *Stanbury* J. et al. The metabolic basis of inherited disease. New York, 1960.
3в. *Reuss A.* Wien. med. Wochenschr., 1908, 799.
3г. *Richterich R.* Enzymopathologie. Berlin, 1958, S. 148.
4. *Дубинин Н. П.* Основы генетики популяций. В. кн. «Актуальные вопросы современной генетики». М., Изд-во МГУ, 1966, стр. 221.
5. *Астауров Б. Л.* В кн. «Актуальные вопросы современной генетики». М., Изд-во МГУ, 1966, стр. 368.
6. *Эфроимсон В. П.* В кн. «Актуальные вопросы современной генетики». М., Изд-во МГУ, 1966, стр. 302.
7. *Pauling L.* et al. Science, 1949, **110**, 543.
8. *Bingold K.* Deutsch. med. Wochenschr., 1955, № 13, 603.

ЧАСТЬ II

Ферментные методы анализа



ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОФЕРМЕНТОВ

Определение кофермента А[1]

(КФ 2.3.1.9)

Кофермент А (КоА) участвует в многочисленных важных биохимических реакциях как в свободной форме (частично), так и в виде ацил-кофермента А (преимущественно). Некоторые из них пригодны для определения КоА. В отдельных реакциях КоА вновь образуется в процессе взаимодействия реагирующих веществ; скорость реакции является, таким образом, мерилом содержания КоА. Эти методы требуют стандартного препарата КоА точно известной чистоты, что не всегда достижимо. Поэтому следует принципиально предпочесть способы определения по методу конечного значения.

Различные способы анализа не дают полностью совпадающих результатов; их специфичность неодинакова.

I. Определение при помощи β-оксиацил-КоА-дегидрогеназы (ОАДГ)[2]. Определяются SH-КоА, дефосфо-КоА, пантетеин, N-(ацетил-β-аланилцистеамин), N-ацетилцистеамин и другие соединения [1].

Анализ можно вести так, что определяются одновременно и окисленные соединения.

II. Метод, использующий фосфотрансацетилазу[3] (ФТА), позволяет определять только HS-КоА (скоростью реакции с дефосфо-КоА можно пренебречь [2]).

III. Определение при помощи тиокиназы[4] (ТК). Определяются HS-КоА и дефосфо-КоА. Пантетеин не реагирует [3].

IV. Определение с ферментом расщепления цитрата (ФРЦ). Определяется только HS-КоА (экстраполяцией исключается реакция с дефосфо-КоА [4]).

Результаты анализов при помощи ФТА и ФРЦ согласуются в пределах точности измерения, что следует приписать практически одинаковой специфичности обоих методов определения. Методы, использующие ТК и ОАДГ, отличаются меньшей специфичностью.

Метод с ФТА следует предпочесть методу с ФРЦ ввиду большей устойчивости фермента, поскольку (как при работе с тканевыми

---

[1] Метод можно использовать и для анализа растительного материала.
[2] КФ 1.1.1.35.
[3] КФ 2.3.1.8.
[4] КФ 6.2.1.2; 6.2.1.3.

экстрактами) пробы обычно не содержат таких количеств ионов фосфата и натрия, которые мешали бы определению первым методом.

Необходимо учитывать, что содержание ферментативно активного КоА при хранении его препаратов уменьшается относительно быстро.

Определение ацетоацетил-кофермента А [5][1]

(КФ 1.1.1.36)

Принцип. Фермент β-оксиацилдегидрогеназа (ОАДГ)[2] катализирует следующий частный процесс цикла жирных кислот:

$$H_3C{-}\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}}{-}CH_2{-}CO \sim SKoA^{+} + НАД^{+} \rightleftarrows H_3C{-}\underset{\displaystyle O}{\underset{\|}{C}}{-}CH_2{-}CO \sim SKoA +$$

$$+ НАД\text{-}H + H^{+}.$$

Реакция основана на превращении НАД, ее можно измерять оптическим методом Варбурга. Ее константа равновесия при pH 7 позволяет гидрировать ацетоацетил-КоА количественно посредством восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (НАД-H_2). Течение реакции измеряют спектрофотометрически по изменению экстинкции при длине волны 340 *ммк*.

Реактивы (все растворы готовят на дистиллированной воде): 1) однозамещенный фосфат калия (0,2 *М* раствор): 2,722 *г* KH_2PO_4 растворяют в воде и объем доводят до 100 *мл*; 2) фосфатный буферный раствор (0,2 *М* pH 6,8) : 1,361 *г* KH_2PO_4 и 1,781 *г* $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ растворяют в воде и объем доводят до 100 *мл*; 3) раствор едкого калия концентрации около 8 *М*: 45 *г* NaOH растворяют (при охлаждении) в воде и объем доводят до 100 *мл*; 4) двууглекислый калий (приблизительно 1 *М* раствор): 10 *г* $KHCO_3$ растворяют в воде, после чего объем доводят до 100 *мл*; 5) хлорная кислота (приблизительно 4 *М* раствор): 35 *мл* 70%-ной кислоты разбавляют водой до 100 *мл*; 6) этилендиаминтетраацетат (0,1 *М* раствор): 1,86 *г* ЭДТА $Na_2H_2 \cdot 2H_2O$ растворяют в воде и объем доводят до 50 *мл*; 7) раствор восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (около 0,01 *М* НАД-H_2): 9,3 *мг* НАД-H-Na_2 растворяют в 1 *мл* воды; 8) β-оксиацилдегидрогеназа (ОАДГ)[3]: около 3 *мг* белка в 1 *мл*. Основную взвесь[4] в фосфатном буфере (раствор 2), в котором имеется 0,005 *М* этилендиаминтетраацетата, разбавляют тем же буфером до 3 *мг* белка в 1 *мл*.

Растворы β-оксиацилдегидрогеназы сохраняются при 0° долгое время. Частое замораживание и оттаивание приводит к быстрому падению активности.

---

[1] Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

[2] КФ 1.1.1.35.

[3] КФ 1. 1. 1.35

[4] Приготовление см.: Stern J. (Bioch. Bioph. Acta, 1957, **26**, 448). 1 *мг* белка в основной взвеси соответствует 7800 ед. (единица фермента — количество его, которое при 20° и 366 *ммк* снижает экстинкцию НАД-H_2 на 0,001 в минуту, при объеме раствора 2 *мл* и толщине слоя 1 *см*).

Растворы ацетоацетил-КоА должны иметь значения pH между 4 и 6; замороженными они сохраняются месяцами. Щелочи омыляют растворы ацетоацетил-КоА почти так же быстро, как растворы ацетил-КоА. Растворы обоих этих веществ чувствительны к действию крепкой кислоты. Следует избегать примесей меркаптанов, особенно цистеина, при значениях pH выше 6,5.

Раствор НАД-H_2 еженедельно готовят свежий и сохраняют всегда при 0°. Все остальные растворы сохраняются неограниченное время, но для того, чтобы предотвратить рост микроорганизмов, их следует держать в холодильнике. Для буферного и щелочного растворов применяют бутыли из полиэтилена (можно в посуде из нейтрального стекла).

Техника. Подготовку анализируемого материала ведут так, как указано при описании определения ацетил-КоА (см. стр. 93). Требуются растворы 3 и 5 (см. выше). Для того чтобы концентрировать растворы, применяют высушивание замораживанием вместо экстракции фенолом.

Измерение ведут при комнатной температуре при длине волны 340, 334 или 366 *ммк*. Толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 2 *мл*. Измерение ведут против холостой пробы (реактивы без исследуемого материала).

Последовательно отмеривают пипеткой в кюветы и хорошо перемешивают следующие растворы (в *мл*):

	Основной опыт	Холостая проба
Фосфатный буферный раствор (2)	0,50	0,50
Проба	До 1,30	—
Раствор ЭДТА (6)	0,05	0,5
Раствор НАД-H_2 (7)	0,05	0,01
Вода	До 1,99	До 1,99

Измеряют экстинкцию E_1. Затем вносят при помешивании в обе кюветы по 0,005 *мл* раствора ОАДГ (реактив 8), около 100 единиц.

Через 3—4 минуты измеряют ставшую постоянной экстинкцию E_2.

Примечание. Концентрацию НАД-H_2 выбирают так, чтобы экстинкция при 366 *ммк* лежала в хорошо измеряемой области (360—370 *ммк*). Если измерение ведут при 340 или 334 *ммк*, то в смесь основного опыта вносят пипеткой только 0,03 *мл* раствора НАД-H_2. Посредством добавления НАД-H_2 в контрольную кювету устанавливают, что при $E_2 = 0$ в анализируемой смеси есть еще НАД-H_2. Рекомендуется количество ацетоацетил-КоА соразмерить так, чтобы разница экстинкций $\Delta E = E_1 - E_2$ не превосходила 0,500.

Вычисление. При объеме жидкости в кювете 2 *мл* (см. выше) и толщине слоя 1 *см* получают следующее количество ацетоацетил-КоА в растворе исследуемого продукта, добавленного в кювету (т. е. в 0,7 *мл*); после измерения при 366 *ммк*: $0{,}607 \cdot \Delta E \cdot \frac{V}{v}$ *мкмолей*; после

измерения при 340 *ммк*: $0{,}322 \cdot \Delta E \frac{V}{v}$ *мкмолей* ацетоацетил-КоА во всей пробе;

после измерения при 334 *ммк*: $0{,}341 \cdot \Delta E \cdot \frac{V}{v}$ *мкмолей* ацетоацетил-КоА во всей пробе,

где V — общий объем раствора ацетоацетил-КоА, в *мл*;

v — аликвота раствора ацетоацетил-КоА, внесенная в опыт, в *мл*; $\Delta E = E_1 - E_2$;

Е — коэффициент экстинкции НАД-H_2;

значения для 340 *ммк*: 6,22; для 334 *ммк*: 5,87; для 366 *ммк*: 3,3 *см²/мкмоль*.

Пример. 10 *мкмолей* кофермента А посредством дикетонового метода были превращены в ацетоацетил-кофермент А.

Объем всей пробы: 2,5 *мл*.

В опыт было внесено 0,02 *мл*.

Измерения вели при длине волны 366 *ммк*; $E_1 = 0{,}774$; $\varepsilon_2 = 0{,}638$; $\Delta E = 0{,}136$:

$$0{,}607 \cdot 0{,}136 \cdot \frac{2{,}5}{0{,}02} = 10{,}3 \text{ мкмолей ацетоацетил-КоА во всей пробе;}$$

с 0,03 *мл* были получены следующие значения:

$$E_1 = 0{,}782;\ E_2 = 582;\ \Delta E = 0{,}200.$$

$$0{,}607 \cdot 0{,}200 \cdot \frac{2{,}5}{0{,}03} = 10{,}1 \text{ мкмолей ацетоацетил-КоА во всей пробе.}$$

Источники ошибок. Чистейшие препараты β-оксиацилдегидрогеназы (см. стр. 86) практически свободны от β-кетоацилтиолазы [1]. Ее присутствие приводит к повышенным значениям ацетил-КоА. Нельзя также определять ацетоацетил-КоА в присутствии свободного КоА, пантетеина, пантетеинфосфата или N-ацетилцистеамина ферментом, содержащим тиолазу. Производные S-ацетоацетила меркаптанов гидрируются β-оксиацилдегидрогеназой и НАД-H_2, так же как и более высокие гомологи ацетоацетил-КоА (см. ниже о специфичности метода).

β-Оксиацилдегидрогеназа не проявляет ясно выраженной специфичности ни в отношении меркаптогрупп, ни в отношении β-кетоацильных групп.

Наряду с КоА-производным ацетоуксусной кислоты ($K_м = 0{,}4 \cdot 10^{-4}$ *M*) посредством НАД-H_2 гидрируются также и ее сложные тиоловые эфиры с пантетеинфосфатом ($K_м = 2{,}2 \cdot 10^{-4}$ *M*) или N-ацетилцистеамином ($K_м = 90 \cdot 10^{-4}$ *M*). Значения $K_м$ относятся к ферменту, полученному из овечьей печени; β-оксиацилдегидрогеназа из свиной печени в отношении значений $K_м$ отличается лишь незначительно. Однако, согласно многочисленным данным, существует только одна β-оксиацилдегидрогеназа [2], т. е. фермент превращает β-окси- или

[1] КФ 2.3.1.16.
[2] 1.1.1.35.

β-кетоациловые соединения КоА любой длины цепи приблизительно до C_{20}. Таким образом, при помощи этого фермента невозможна дифференциация длины цепи. Другие карбонильные соединения, например дериваты α-кетокислот, альдегиды, кетоны и свободные, т. е. не связанные с КоА, β-кетокислоты не реагируют. Обратимое гидрирование свободной ацетоуксусной кислоты в *D* (—) β-оксимасляную кислоту катализируется другим ферментом. Точность метода 5%.

Другие методы определения ацетоацетил-КоА (КФ 1.1.1.36)

Ацетоацетил-кофермент А расщепляется β-кетоацилтиолазой согласно уравнению:

$$\text{ацетоацетил-КоА} + \text{КоА SH} \rightleftarrows 2\ \text{ацетил-КоА}.$$

Количество ацетоацетил-КоА измеряют по зависимой от pH абсорбции ацетоацетил-кофермента при длине волны 366 *ммк*, которая может быть увеличена Mg^{2+} [6]. Возможна также комбинация с ферментом ариламинацетилазой [7] [1] или с конденсирующим ферментом [8]. Пропись очистки β-кетоацилтиолазы [2] оказалась, однако, плоховоспроизводимой, почему этот метод не рекомендуется для повседневного применения.

Определение кофермента А при помощи фосфотрансацетилазы [8а] (КФ 2.3.1.8)

Принцип. Фосфотрансацетилаза (ФТА) катализирует обратимый перенос ацильных групп с фосфата на кофермент А(КоА):

$$\text{КоА-SH} + CH_3CO \cdot OPO_3H_2 \rightleftarrows \text{КоА-}SCOCH_3 + H_3PO_4.$$

В результате образуются ацетил-КоА и свободная фосфорная кислота. При pH 8,0 и 28° равновесие реакции лежит с правой стороны.

При избытке ацетилфосфата реакция протекает практически количественно. Ацетил-КоА поглощает при 233 *ммк* сильнее, чем КоА. Анализ ведут, измеряя увеличение экстинкции при 233 *ммк*. Таким образом, можно определить только КоА-Н (если не прибавлять восстанавливающих реактивов).

Реактивы: 1) 1 н. раствор соляной кислоты: 83 *мл* HCl (уд. вес 1,19) разводят бидистиллированной водой до 1000 *мл*; 2) трис-буфер (0,1 *М*, pH 7,6): 12,1 *г* трис-оксиметиламинометана растворяют в 500 *мл* бидистиллированной воды, доводят добавлением 1н.

---

[1] КФ. 2.3.1.5.
[2] КФ 2.3.1.16.

раствора соляной кислоты (около 70 *мл*) до pH 7,6 и доливают бидистиллированной водой до 1000 *мл*; 3) 0,1 *М* раствор ацетилфосфата: 15,5 *мг* литиевой соли ацетилфосфата растворяют в 0,5 *мл* бидистиллированной воды и доводят той же водой объем до 1 *мл*; 4) препарат фосфотрансацетилазы (ФТА), содержащий 1 *мг* белка в 1 *мл* 3 *М* раствора сульфата аммония.

Все растворы хранят в холодильнике, откуда перед анализом берут необходимое количество. Трис-буфер можно в течение дня оставлять при комнатной температуре, раствор ацетилфосфата необходимо держать холодным даже в процессе анализа и обновлять каждые 2 дня. Раствор фермента можно хранить при 0—4° больше месяца.

Т е х н и к а. Анализ можно вести в любом тканевом экстракте при соблюдении двух условий: 1) достаточной оптической прозрачности при 233 *ммк* и 2) умеренном содержании неорганического фосфата и ионов натрия (концентрация менее 10^{-4} *М* фосфата и 10^{-2} *М* Na^+). Метод с ФТА не рекомендуется применять для анализа дрожжевых экстрактов, богатых ацетил-КоА, что мешает анализу. Для анализа берут пробу, содержащую около 1 *мг* КоА в 1 *мл*.

Поглощение света определяют при 233 *ммк*, толщине слоя в кварцевой кювете 1 *см*; объем пробы — 3 *мл*, температура комнатная, измерение против кюветы, содержащей трис-буфер. В кювету помещают последовательно 2,69 *мл* трис-буфера, 0,1 *мл* раствора ацетилфосфата и 0,2 *мл* пробы, размешивают стеклянной палочкой и измеряют экстинкцию E_0. После этого в кювету добавляют 0,01 *мл* суспензии ФТА, размешивают и вновь определяют оптическую плотность E_1 до остановки реакции (от 3 до 5 минут). Необходимо также учесть «собственную» экстинкцию фермента: с этой целью в кювету добавляют еще 0,01 *мл* суспензии, размешивают и отсчитывают E_2. Величина $E_2 - E_1 = \Delta E_{фта}$ обычно лежит между 0 и 0,010. Величину $\Delta E = E_1 - E_0 - \Delta E_{фта}$ берут для вычисления. Для вычисления пользуются формулой:

$$\frac{\Delta E \cdot V}{\varepsilon \cdot d \cdot v} = \text{мкмолям КоА в 1 мл пробы},$$

где ΔE — разность экстинкций, V — объем пробы, v — объем пробы, взятой в опыт, ε — коэффициент разности экстинкций между КоА и ацетил-КоА (при 233 *ммк*, 4,44 *см²/мкмоль*). Сюда вводят поправку на собственную экстинкцию фермента, равную

$$\Delta E = E_1 - E_0 - \Delta E_{фта},$$

$$\frac{\Delta E \cdot 3}{4{,}44 \cdot 0{,}2} = \Delta E \cdot 3{,}38 = \text{числу мкмолей КоА-SH в 1 мл анализируемого}$$

раствора. Умножая на величину молекулярного веса КоА-SH (767,6), можно выразить этот результат в *мкг* КоА-SH в 1 *мл*.

Пример. 10 *мл* пробы содержат 9,86 *мг* КоА. При отсчете экстинкций получены следующие величины:

$E_0 = 0{,}236$; E_1 (по истечении 4 мин.) $= 0{,}543$; $E_2 = 0{,}552$; $\Delta E_{фта} = 0{,}009$.

Отсюда

$$\Delta E = E_1 - E_0 - \Delta E_{фта} = 0{,}298.$$

Таким образом:

$$0{,}298 \cdot 3{,}38 \cdot 767 = 774 \text{ мкг КоА-SH в 1 мл пробы.}$$

Учитывая величину взятой навески, получают, что содержание КоА-SH в исследованном препарате равняется 78,6%.

Наличие примесей больших количеств глютатиона в пробе мешает реакции, однако при pH 7,6 этим можно практически пренебречь. Точность метода 4%.

Определение бензоил-кофермента А [9]

П р и н ц и п. Бензоиловый дериват кофермента А (B_z-КоА) может быть определен, после расщепления при щелочном значении pH, ферментативными методами, применяемыми для определения КоА. Расщепление протекает по типу обычного щелочного омыления сложных эфиров

$$C_6H_5\text{—}\overset{O}{\overset{\|}{C}}\text{—S—КоА} + 2OH^- \rightarrow C_6H_5\text{—}\overset{\bar{O}}{\overset{\|}{C}}\text{—O} + \text{КоAS} + H_2O.$$

Сложные тиоэфиры кислот с низким значением pK в щелочной среде гидролизуются быстрее, чем сложные эфиры с более высокими значениями. Время полугидролиза КоА сложных тиоэфиров, насыщенных жирных кислот с длиной цепи от C_2 до C_8 (pK 4,7—4,9) при 30° (в 0,1 н. растворе NaOH), составляет от 1 до 2 минут. Для бензоил-КоА (B_z-КоА) с pK 4,17 оно может быть несколько бо́льшим. Примененная в данном методе продолжительность расщепления (20 минут) достаточна. HS-КоА легко окисляется частично в КоА-SS-КоА, поэтому определяют B_z-КоА как сумму HS-КоА + КоА = = SS-КоА по тесту с ОАДГ.

Р е а к т и в ы. 1) едкий натрий (1н. раствор): 4,0 *г* едкого натра растворяют в бидистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*; 2) соляная кислота (приблизительно 1 н. раствор): 8,3 *мл* HCl (уд. в. 1,19) растворяют в бидистиллированной воде и объем доводят до 100 *мл*. Остальные реактивы см. определение КоА на стр. 85.

Т е х н и к а. Точно взвешивают 10—15 *мг* бензоил-КоА (B_z-КоА) и растворяют в 8,0 *мл* 0,1н. раствора едкого натра (раствор 1). Раствору дают постоять 20 минут при комнатной температуре, устанавливают посредством 1н. раствора соляной кислоты (раствор 2) pH 9,0, затем доливают бидистиллированной водой до 10,0 *мл*. Общее содержание КоА в этом растворе определяют при помощи ОАДГ [1].

---

[1] Методы, использующие ОАДГ (оксиацил-КоА-дегидрогеназу), имеют то преимущество, что позволяют вести раздельное количественное определение окисленного КоА, КоА SH и их производных. Его можно использовать как универсальный способ определения КоА-активных соединений.

Пример. 11,2 *мг* B_z-КоА были растворены в 8 *мл* 0,1 н. раствора NaOH (1,40 *мг/мл*) и проанализированы. При длине волны 366 *ммк* были измерены следующие экстинкции:

$$E_0 = 0{,}300;\ E_1 = 0{,}178;\ E_2 = 0{,}183;\ \text{таким образом, } \Delta E \text{ было } E_0 - E_1 = 0{,}122;$$

$$\Delta E\ \text{ОАДГ} = 0{,}005 \text{ и } \Delta E_{\text{испр.}} = 0{,}127.$$

Вычисление. Для вычисления вводят молекулярный вес бензоил-КоА—870,6·0,127·9,10·870,6 = 1005 *мкг* B_z-КоА/*мл* раствора пробы после предварительной обработки для испытания КоА.

Вследствие добавления перед опытом тиогликолевой кислоты, дикетена и КОН получилось разведение на 10,30 *мл*. Таким образом, концентрация анализированных 8,0 *мл* растворов B_z-КоА была

$$1005 \cdot 10{,}30/8{,}00 = 1295 \text{ мкг } B_z\text{-КоА/мл}.$$

Если расчет вести из первоначальной навески препарата, то можно установить и чистоту препарата.

$$\frac{1295}{1400} \cdot 100 = 92{,}5\% .$$

Относительно источников ошибок см. определение кофермента А. Точность метода 7%.

Определение ацетил-кофермента А [10]

(КФ 2.3.1.9)

Принцип. Для определения ацетил-кофермента А наиболее пригодно ферментативное ацетилирование ароматических аминов. По сравнению с другими методами оно отличается следующими преимуществами: разница свободной энергии гидролиза ацилмеркаптановой и карбоамидной связей составляет самое меньшее 4 *ккал/моль*, которая обеспечивает количественное превращение этих связей; при подходящем выборе акцептора реакцию можно проследить спектрофотометрически; пропись для обогащения ариламинацетилазы хорошо воспроизводима и требует небольших затрат времени и материала. В качестве акцептора амина сначала служил сульфонамид или *п*-аминобензойная кислота, позднее также *п*-аминазобензолсульфоновая кислота и аминоазобензол; наиболее подходящим является *п*-нитроанилин.

$$CH_3{-}CO{\sim}SKoA + H_2N{-}C_6H_4{-}NO_2 \xrightarrow[\text{ацетилаза}]{\text{ариламин-}} CH_3{-}CO{-}NH{-}C_6H_4{-}NO_2 + HS\text{-}KoA.$$

Максимум поглощения *п*-нитроанилина при $\lambda_{\text{макс}} = 388$ *ммк*, ацетилированного основания при $\lambda_{\text{макс}} = 318$ *ммк*. При 405 *ммк* абсорбция *п*-нитроацетанилида практически равна нулю, в то время как молярный коэффициент экстинкции *п*-нитроанилина при этой

длине волны составляет еще около 80% максимального значения. Этим методом могут быть легко обнаружены менее чем 0,01 *мкмоля* ацетил-кофермента А (т. е. меньше 8 *мкг/мл*).

Реактивы. Все растворы изготовляют на дистиллированной, деионизованной воде, свободной от катионов. 1) однозамещенный фосфат калия (0,2 *М* раствор): 2,722 *г* KH_2PO_4 растворяют в дистиллированной воде и по растворении доводят объем до 100 *мл*; 2) фосфатный буферный раствор ((0,2 *М*; pH 6,8): 1,361 *г* KH_2PO_4 и 1,781 *г* $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ растворяют в воде и объем доводят до 50 *мл*; 3) раствор едкого калия (приблизительно 8 н.): 45 *г* едкого калия растворяют при охлаждении в дистиллированной воде и объем доводят до 100 *мл*; 4) раствор едкого калия (приблизительно 0,5н.): 6,25 *мл* 8 н. раствора едкого калия (3) разводят до 100 *мл* непосредственно перед этим прокипяченной водой (свободной от CO_2); 5) бикарбонат калия (приблизительно 1*М* раствор): 10 *г* $KHCO_3$ растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*; 6) хлорная кислота (приблизительно 4 *М* раствор): 35 *мл* 70%-ной кислоты разводят дистиллированной водой до 100 *мл*; 7) тиогликолевая кислота (приблизительно 0,1 *М* раствор): 0,085 *мл* 80%-ной кислоты разводят дистиллированной водой до 10 *мл*; 8) этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) 0,1 *М* раствор: 1,86 ЭДТА — $Na_2H_2 \cdot 2H_2O$ растворяют в дистиллированной воде и объем доводят до 50 *мл*; 9) *п*-нитроанилин (0,002 *М* раствор): 13,8 *мг* *п*-нитроанилина растворяют в 1 *мл* 96%-ного этанола, доливают дистиллированной водой до 50 *мл*; 10) ариламинацетилаза (см. стр. 97): в зависимости от активности фермента от 5 до 10 *мг* сухого порошка фермента растворяют в 0,2 *мл* 0,2 *М* фосфатного буферного раствора с pH 6,8 (2); на каждый опыт требуется 25 единиц, что составляет 0,01 *мл* этого раствора фермента. Растворы фермента даже в холодильнике сохраняются лишь ограниченное время. Поэтому растворяют не больше того, что требуется для работы в течение одной недели. Растворы ацетилкофермента А остаются неизменными на холоде при pH от 4 до 6. В щелочном растворе быстро происходит гидролиз; активность постепенно уменьшается также и в сильнокислом растворе. Нейтральные растворы тиогликолата подвергаются чрезвычайно быстрому самоокислению. Кислый раствор сохраняют в холодильнике не более 10—14 дней. Остальные растворы при предохранении их от роста микроорганизмов (хранение в холодильнике) месяцами остаются стойкими. Буферный раствор и щелочные растворы держат в хорошо закупоренных полиэтиленовых бутылях (можно в посуде из химико-лабораторного стекла).

Техника. *Подготовка исследуемого материала*. К раствору пробы (см. в тексте) в пробирке прибавляют десятую часть объема хлорной кислоты (6) и хорошо перемешивают. Через 3 минуты смесь нейтрализуют, прибавляют каплями 8 н. раствор едкого калия (3) и устанавливают pH между 6,3 и 6,7, осторожно добавляя по каплям раствор бикарбоната калия (5). Осажденный белок и хлорат калия отцентрифуговывают при 3000 *g* (5 мин.). Надосадочную жидкость

возможно более полно отбирают в мерный цилиндр объемом 5 *мл*; осадок промывают небольшим количеством холодной воды, центрифугируют и соединяют промывную воду с надосадочной жидкостью. Аликвоту этого раствора без дальнейшей обработки применяют для определения. Водные растворы, содержащие ацетил-кофермент А, могут сохраняться замороженными несколько дней. Если ацетил-кофермент А определяют в тканях, то экстракцию нужно проводить особенно основательно. Обычно полученный экстракт необходимо концентрировать в два-три раза.

Постановка опыта. Измерение ведут при длине волны 405 *ммк*; толщина слоя 1 *см*. Объем анализируемой жидкости 2 *мл*; температура комнатная. Измерения ведут против контрольного опыта.

Последовательно растворы отмеривают пипеткой в кюветы (в *мл*)

	Основной опыт	Контрольный опыт
Раствор пробы	1,1	—
Фосфатный буфер (2)	0,50	0,50
Раствор ЭДТА (8)	0,10	0,10
Раствор *n*-нитроанилина (9)	0,10	0,05
Раствор тиогликолевой кислоты (7)	0,10	0,10
0,5 н. раствор едкого калия (4)	0,02	0,02
Дистиллированная вода	До 1,98	До 1,98

Растворы хорошо смешивают, измеряют экстинкцию E_1. Реакцию начинают примешиванием в обе кюветы 0,02 *мл* раствора фермента (10). Следят за падением экстинкции до установления постоянного значения. Измеряют конечное значение E_2.

Примечание. Посредством добавления *n*-нитроанилина в сравнительную кювету следует убедиться в том, что и при $E_2 = 0$ имеется еще достаточный избыток акцептора: кроме того, это дает возможность работать с оптимальными концентрациями *n*-нитроанилина и в области хорошей считываемости. Проба должна содержать столько ацетил-кофермента А, чтобы ΔE стало не больше 0,300—0,400 (определять по возможности посредством предварительного опыта).

Вычисление. При 2 *мл* объема анализируемой жидкости и 1 *см* толщине слоя имеем:

$$0{,}195 \cdot \Delta E \frac{V}{v} = \text{мкмолей ацетил-КоА во всем растворе пробы},$$

где V — объем всего раствора пробы, *мл*, v — аликвота, взятая для опыта, *мл*, $\Delta E = E_1 - E_2$, $\varepsilon = 1{,}025 \cdot 10^7$ *см*^{2}·*моль*$^{-1}$ — молярный коэффициент экстинкции *n*-нитроанилина при 405 *ммк*.

Если определение начинают с 0,01 до 0,02 *мл* раствора фермента, то поправка на полученное при этом разведение излишня.

Пример. Смесь, в которой находилось 0,15 *мкмолей* ацетоацетил-кофермента А, была расщеплена посредством 0,25 *мкмолей* кофермен-

та А и фермента β-кетоацилтиолазы[1] до ацетил-кофермента А; объем смеси составил 2,5 *мл*, он был полностью перенесен из кюветы в центрифужную пробирку, кювета сполоснута 0,5 *мл* воды; общий объем 3,0 *мл*.

Для осаждения белка и нейтрализации до pH 6,6 применяли 0,3 *мл* раствора хлорной кислоты (6), 0,15 *мл* раствора едкого калия (3) и 0,04 *мл* раствора $KHCO_3$ (5). После центрифугирования, промывания 0,5 *мл* воды и повторного центрифугирования надосадочные жидкости были соединены. Объем 3,75 *мл*, из них для определения были использованы 0,5 *мл*.

$$E_1 = 0{,}563;\ E_2 = 0{,}355;\ \Delta E = 0{,}208;$$

$$0{,}195 \cdot 0{,}208 \cdot \frac{3{,}75}{0{,}5} = 0{,}304 \text{ мкмолей ацетил-КоА в } 3{,}75 \text{ мл раствора пробы}$$

В том же опытном растворе принципиально возможно определение (после прибавления соответствующих ферментов и кофакторов) всех субстратов, которые могут в стехиометрической реакции перейти в ацетил-кофермент А.

Реакция протекает по схеме:

$$\beta\text{-окси-}\beta\text{-метилглютарил-кофермент А} \xrightarrow{\text{десмолаза}} \text{ацетоацетат} + \text{ацетил-КоА}.$$

Источники ошибок. Так как препарат ариламиноацетилазы не свободен от других ферментов, могут быть получены чрезмерно высокие значения в присутствии некоторых производных КоА. Ацетоацетил-кофермент А поэтому определяют отдельно и вычитают найденное значение (1 *моль* ацетоацетил-кофермента А дает 2 *моля* *п*-нитроацетанилида). Активность десмолазы раствора фермента может быть в большой степени устранена посредством многократного оттаивания и замораживания.

В присутствии этилендиаминтетраацетата активность этого фермента, ввиду его потребности в магнии, и без того минимальная. Для определения ацетил-кофермента А, наряду с пропионил-коферментом А, нужно измерить синтез цитрата (см. раздел «Другие методы определения для ацетил-кофермента А», стр. 96).

Свободный кофермент А в высоких концентрациях ингибирует реакцию ацетилирования: 0,1 *мкмоль* кофермента А сокращает скорость реакции на 50%. Так как при превращении образуется свободный коэффициент А, рекомендуется вводить для определения только до 0,05 *мкмолей* ацетил-кофермента А.

Ариламинацетилаза (см. стр. 97) полностью, хотя и обратимо, ингибируется *п*-хлормеркурибензоатом (10^{-5} *М*). Поэтому присутствие следов тяжелых металлов в составе смеси опыта приводит к нарушению активности фермента.

Высокая, но не постоянная начальная экстинкция может быть вызвана гомопротеидами. Самоокисление, препятствующее восста-

---

[1] См. в кн.: Bergmeyer H. Methoden der enzymatischen Analyse. Weinheim 1962, S. 132.

новлению флавина, можно устранить посредством обработки опытной смеси газообразным CO_2 до начала определения и проведением работы в хорошо закупоренных кюветах.

Ариламинацетилаза обладает в отношении компонентов ацила высокой специфичностью. Так, скорость превращения бутирил-кофермента А составляет только 4% скорости, измеренной для ацетил-кофермента А. Пальмитил-кофермент А неактивен и ингибирует реакцию ацетил-кофермента А при концентрации 10^{-5} *М* приблизительно на 50%. Ацетоацетил-β-окси-β-метилглютарил, β-окси-бутирил- или кротонил КоА не образуют *n*-нитроациланилидов.

Специфичность фермента в отношении тиоловых компонентов ацетилмеркаптанов незначительна.

Значения $K_м$ для ариламинацетилазы составляют для ацетил-кофермента А $2{,}4 \cdot 10^{-5}$ *М*, для NS-диацетил-цистеамина $550 \cdot 10^{-5}$ *М*.

Если ацетил-кофермент А должен быть определен наряду с производными ацетила пантетеинфосфата, пантетеина или N-ацетил-цистеамина, то применяют один из методов, описанных ниже.

Другие методы определения ацетил-кофермента А [11]

Чтобы избежать недостатков, связанных с указанной выше ариламинацетилазной реакцией, особенно с незначительной специфичностью к субстрату (тиоловые компоненты) и недостаточной чистотой фермента, а также небольшой скоростью реакции, следует определять ацетил-кофермент А в сложном опыте, согласно уравнению (3):

$$\text{Ацетил-S-КоА} + \text{оксалацетат}^{2-} + H_2O \rightarrow \text{цитрат}^{3-} + \text{HS-КоА} + H^+ \quad (1)$$

$$L\text{-малат}^{2-} + \text{НАД}^+ \rightarrow \text{оксалацетат}^{2-} + \text{НАД-Н} + H^+ \quad (2)$$

$$L\text{-малат}^{2-} + \text{ацетил} \sim S^-\text{КоА} + \text{НАД}^+ + H_2O \rightarrow \text{цитрат}^{3-} + \text{НАД-Н} + 2H^+ + \text{HS-КоА} \quad (3)$$

Реакция (2) катализируется *L*-малатдегидрогеназой, реакция (1) — конденсирующим ферментом.

Получение этого конденсирующего кристаллического фермента из свиного сердца требует хорошо оборудованной ферментной лаборатории и некоторый опыт; до настоящего времени фермента еще нет в продаже. По этой причине определение ацетил-кофермента А, согласно уравнению (3), здесь не описано [1].

В качестве третьего ферментативного метода определения ацетил-кофермента А был описан арсенолиз в присутствии фосфотрансацетилазы из Clostridium Cluyveri [12].

При определенных предпосылках могут быть использованы неферментативные методы. Речь идет о таких определениях, как реакция с ацетилгидроксамовой кислотой, замедленная реакция нитропрусида и УФ-спектроскопия [12, 13, 14].

---

[1] Детали метода см.: Ochoa S. В кн.: Colowick S. a. Kaplan O. Methods in Enzymology. N. Y., 1957, Bd 1, p. 687.

Получение ариламинацетилазы [10]

Сухой ацетоновый порошок фермента [10] из печени голубя растирают с 10 весовыми частями воды в ступке; охлаждают 96 *мл* экстракта, смешивают с 76 *мл* ацетона, осадок выбрасывают, в надосадочную жидкость вносят 193 *мл* ацетона. Осадок растворяют в 15 *мл* воды, смешивают с 90 *мл* геля окиси алюминия C_γ (11 *мг* сухого вещества на 1 *мл*), центрифугируют, осадок промывают 100 *мл* воды, элюируют фермент 100 *мл* 0,01 *М* фосфатного буферного раствора калия (рН 7,8). Добавляют на 100 *мл* 100 *мкмолей* ЭДТА, раствор лиофилизируют.

Специфическая активность около 275 *ед/мг*. Точность метода около 6%.

Определение акрилил-кофермента А [15]

Акрилил-кофермент А аминируется при помощи акрилил-КоА-аминазы и NH_4Cl, причем экстинкция уменьшается при длине волны 263 *ммк*. При помощи этого уменьшения экстинкции акрилил-кофермент А может быть определен количественным образом.

П р и н ц и п. Акрилил-кофермент А-аминаза (см. стр. 98) катализирует аминирование акрилил-кофермента А солями аммония в β-аланил-кофермент А:

$$CH_2{=}CH-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}\sim S{-}KoA + NH_3 + H^+ \rightleftarrows H_3N^+{-}CH_2{-}CH_2{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}\sim S{-}KoA$$

Константа равновесия этой реакции при рН 7,5 и 25° равняется $2{,}58\cdot10^{13}$ *моль/л*$^{-2}$.

С избыточным количеством соли аммония образуется на 1 *моль* акрилил-кофермента А 1 *моль* β-аланил-кофермента А. Уменьшение количества акрилил-кофермента А измеряется спектрофотометрически.

Р е а к т и в ы: 1) буферный раствор триэтаноламина (1,0 *М*; рН 7,5): 14,9 *г* триэтаноламина растворяют в 25 *мл* воды, устанавливают рН 7,5, добавляя 30 *мл* 2 н. раствора HCl и доливают дистиллированной водой до 100 *мл*; 2) хлористый аммоний (1,0 *М* раствор): 5,3 *г* NH_4Cl растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*; 3) аминаза акрилил-кофермента А (5 *ед/мл*) [1]. Препарат соответственно разводят дистиллированной водой. Раствор сохраняют при —20°.

Был разработан способ для выделения аминазы акрилил-кофермента. Он может быть применен для любого материала, не содержащего кроме акрилил-кофермента А никаких веществ, сильно абсорбирующих при длине волны в 263 *ммк*.

---

[1] Единицей активности фермента является такое количество его, которое за одну минуту снижает экстинкцию с 0,500 до 0,400.

Т е х н и к а. *Подготовки исследуемого материала* [15].

Постановка опыта. Измерение ведут при длине волны 263 *ммк* в кварцевых кюветах объемом 1 *мл*, толщина слоя 1 *см*; объем анализируемой жидкости 1 *мл*; температура комнатная.

Заполняют три кюветы опыта и одну сравнительную. В кюветы растворы отмеривают пипеткой (в *мл*):

Опытная кювета	Сравнительная кювета
(Проба содержит 0,02—0,1 *мкМ* акрилил-кофермента А)	Соответственно объем дистиллированной воды
0,05 *мл* буферного раствора (раствор 1)	0,05 *мл* буферного раствора (1)
0,1 *мл* раствора NH_4Cl (раствор 2)	0,1 *мл* раствора NH_4Cl
Дистиллированная вода до 0,95 *мл*	Дистиллированная вода до 0,95 *мл*

Хорошо смешивают и измеряют экстинкции ε_1 (кювета опыта против сравнительной кюветы). Затем во все 4 кюветы вносят, помешивая, 0,05 *мл* раствора аминазы акрилил-кофермента А и каждые 30 секунд измеряют экстинкции, пока они не перестанут уменьшаться. Конечные значения ε_2 умножают на 1,05 (фактор разведения), вычисляют среднее значение и вычитают его из среднего значения начальных экстинкций. Разницу $\Delta E = E_1 - E_2$ применяют для вычисления.

Количество фермента должно быть таким, чтобы реакция заканчивалась за 1—3 минуты. Большое количество фермента уменьшает специфичность.

Вычисление. Уменьшение экстинкции при 263 *ммк* линейно пропорционально количеству акрилил-КоА в интервале между 0,1 и 0,13 *мкмоль/мл*. Из коэффициента экстинкции 6,7 *см²/мкмоль* для тиоэфирной связи акрилил-кофермента А вычисляется содержание акрилил КоА в смеси опыта:

$$\frac{E}{6,7} = \text{мкмолей акрилил-КоА в смеси опыта.}$$

И с т о ч н и к и о ш и б о к. Сырые экстракты *Clostridium propionicum*, выросшего на β-аланине вместо α-аланина, могут обладать активностью аминазы акрилил-КоА (до 91,6 *ед/мг* белка). Так как белка используется немного, то такие сырые экстракты можно применять в описанных здесь опытах, не опасаясь ошибок или нарушений.

Аминаза акрилил-кофермента А реагирует со следующими веществами (уменьшается скорость реакции в этой последовательности): акрилил-кофермент А, кротонил-КоА, акрилилпантетеин, кротонилпантетеин. Медленно она реагирует с акрилил-N-ацетил-тиоэтаноламином, совсем не реагирует с акрилил-S-тиопропионовой кислотой и кротонил-N-ацетил-тиоэтаноламином.

Скорости реакций сильно отличаются друг от друга.

Например, аминаза акрилил-КоА реагирует с кротонил-КоА лишь с 5%-ной скоростью по сравнению с ее реакцией с акрилил-КоА. Точность метода 5%.

Определение малонилсемиальдегид-кофермента А [16]

Малонилсемиальдегид-КоА восстанавливается посредством β-оксипропионил-КоА-дегидрогеназы и восстановленного никотинамид-адениндинуклеотида (НАДФ-H_2). Уменьшение экстинкции НАДФ-H_2 при длине волны 340 *ммк* служит показателем при измерении .

П р и н ц и п. β-Оксипропионил-КоА-дегидрогеназа[1] катализирует восстановление малонилсемиальдегид-КоА при помощи НАДФ-H_2.

$$\text{Малонилсемиальдегид-КоА} + \text{НАДФ-Н} + H^+ \underset{\longleftarrow}{\xrightarrow{\beta\text{-оксипропионил-КоА-дегидрогеназа}}} \beta\text{-оксипропионил-КоА} + \text{НАДФ}^+.$$

При нейтральном значении pH равновесие этой реакции сильно сдвинуто в правую сторону. На 1 *М* малонилсемиальдегид-КоА окисляется 1 *М* НАДФ-H_2.

Р е а к т и в ы. Часто препарат фермента загрязнен оксидазой НАДФ-H_2 и малонилсемиальдегид-КоА-дегидрогеназой. Однако если применяют достаточно разбавленные растворы фермента, то эти загрязнения не мешают. Это проверяется для каждого препарата фермента в смеси опыта, которая изготовляется, как приведено в разделе «Постановка опыта», но вместо исследуемой пробы содержит дистиллированную воду. Найденное уменьшение НАДФ-H_2 учитывают при вычислении.

1) буферный раствор триэтаноламина (1,0 *М*, pH 7,5): 14,9 *г* триэтаноламина растворяют приблизительно в 50 *мл* дистиллированной воды добавлением 30 *мл* 2н. раствора HCl, устанавливают pH 7,8, затем доливают дистиллированной водой до 100 *мл*; 2) 10^{-3} *М* раствор НАДФ-Н-Na_4: 4,4 *мг* НАДФ-Н-Na_4 растворяют в дистиллированной воде и доводят объем раствора до 100 *мл*; 3) β-оксипропионил-КоА-дегидрогеназу разводят дистиллированной водой до концентрации 0,1 *мг* белка/*мл*. Раствор сохраняют при —20°.

Т е х н и к а. *Подготовка материала.* Малонилсемиальдегид-КоА можно определить описанным здесь методом в любом материале, который не сильно абсорбирует свет при длине волны 340 *ммк*.

Постановка опыта. Измерение ведут при 340 *ммк* в кварцевых кюветах объемом 1 *мл*, толщина слоя 1 *см*; объем анализируемой

---

[1] КФ 1.1.1.59.

жидкости 1 *мл*. Вносят:

Опытная кювета	Сравнительная кювета
0,02—0,1 *мкмолей* малонилсемиальдегида-КоА	0,02 *мл* буферного раствора (1)
0,2 *мл* буферного раствора (1)	Дистиллированная вода до 0,9 *мл*
0,2 *мл* раствора НАДФ-H_2 (2)	
Дистиллированная вода до 0,9 *мл*	

Содержимое кювет хорошо смешивают, измеряют экстинкцию E_1 (кювета опыта против сравнительной кюветы). Затем в обе кюветы вносят 0,1 *мл* раствора фермента (3) и измеряют экстинкцию каждые 30 секунд, пока реакция не закончится. Конечное значение E_1 умножают на 1,1 (фактор разведения).

Количество фермента должно быть соразмерено так, чтобы реакция закончилась за 2—3 минуты.

Вычисление. Уменьшение экстинкции при длине волны 340 *ммк* линейно пропорционально содержанию малонилсемиальдегид-КоА в смеси опыта с концентрацией, колеблющейся между 0,01 и 0,15 *мкмолей*. Содержание фермента вычисляется из коэффициента экстинкции для НАДФ-H_2 (6,3 $см^2$/*мкмоль*):

$$\frac{E_1 - E_2 \cdot 1{,}1}{6{,}3} = \text{мкмолей малонилсемиальдегида-КоА в смеси опыта}.$$

Источники ошибок. Ацетоацетил-КоА реагирует так же, как и малонилсемиальдегид КоА. Малонилсемиальдегидпантетеин и ацетоацетилпантетеин реагируют так же, но при описанных здесь условиях намного медленнее, чем соединения с КоА. Точность метода около 5%.

Определение β-оксипропионил-кофермента А [17]

Скорость образования малонилсемиальдегид-КоА при взаимодействии β-оксипропионил-кофермента А-дегидрогеназы и избыточного количества никотинамидадениндинуклеотида при описанных здесь условиях прямо пропорциональна концентрации β-оксипропионил-КоА.

Принцип. β-оксипропионил-КоА-дегидрогеназа (см. стр. 102) катализирует дегидрирование β-оксипропионил-КоА, зависимое от НАДФ:

$$\text{β-оксипропионил-КоА} + \text{НАДФ} \rightleftarrows \text{малонилсемиальдегид-КоА} + \\ + \text{НАДФ-Н} + H^+. \quad (1)$$

При нейтральном значении pH равновесие сдвинуто влево, при pH 9,4 оно может передвинуться вправо. Определяют скорость образования малонилсемиальдегида-КоА из увеличения экстинкции при 300 *ммк*.

Реактивы: 1) буферный раствор 2-амино-2-метил-1,3-пропандиолгидрохлорида (1,0 *M*, pH 9,4) : 10,51 *г* 2-амино-2-метил-1,3-

пропандиола растворяют в 40 *мл* дистиллированной воды, устанавливают pH 9,4, используя для этого около 20 *мл* 1н. раствора HCl и добавляют дистиллированную воду до 100 *мл*; 2) β-оксипропионил-КоА (10^{-3} *М* раствор, pH 6). Для целей калибрования раствор [1] соответственно разводят дистиллированной водой; 3) никотинамидадениндинуклеотидфосфат ($5 \cdot 10^{-2}$ *М* раствор НАДФ): около 40 *мг* НАДФ-Na_2H_2 растворяют в 1 *мл* дистиллированной воды; 4) калифосфатный буферный раствор (0,01 *М*, pH 7,5): а) 1,74 *г* K_2HPO_4 растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 1000 *мл*, б) 1,36 *г* KH_2PO_4 растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 1000 *мл*. Растворы а и б смешивают в отношении 84 : 16 (по объему); 5) β-оксипропионил-КоА-дегидрогеназа (см. стр. 102) (1 *мг* белка на 1 *мл*). Раствор фермента разводят калифосфатным буферным раствором (раствор 4) до 1 *мг* белка/*мл*.

Раствор фермента сохраняется при −20°, несколько месяцев. Растворы 2 и 3 сохраняют замороженными.

Техника. *Подготовка исследуемого материала.* Описанный здесь метод был первоначально разработан для определения активности оксипропионил-КоА-дегидрогеназы. Он может быть применен для определения этого фермента во всяком материале, который не сильно абсорбирует свет при длине волны в 300 *ммк*.

Постановка опыта. Измерение ведут при длине волны 300 *ммк* в кварцевых кюветах емкостью 1 *мл*; толщина слоя 1 *см*; объем анализируемой жидкости 1 *мл*.

Могут быть наполнены одновременно 3 кюветы опыта. Измерение ведут против сравнительной кюветы с дистиллированной водой вместо раствора пробы.

В кюветы отмеривают пипеткой: в кювету опыта — исследуемый материал (содержащий 0,02—0,15 *мкмолей* β-оксипропионил-КоА) и соответственное количество H_2O в сравнительную кювету, затем в обе кюветы добавляют по 0,1 *мл* буферного раствора (раствор 1), 0,1 *мл* раствора НАДФ (раствор 3) и дистиллированную воду до 0,9 *мл*. Хорошо смешивают и измеряют экстинкцию при 300 *ммк*, затем вносят, помешивая, 0,1 *мл* раствора β-оксипропионил-КоА-дегидрогеназы (см. стр. 102) (5) и через каждые 30 секунд измеряют экстинкцию; отмечают время, которое требуется для увеличения экстинкции на 0,1. Количество фермента должно быть так соразмерено, чтобы это время было равно 1—3 минутам. Большое количество фермента нежелательно, так как препарат загрязнен ферментом, ингибирующим измеряемую реакцию.

Вычисление. Скорость реакции прямо пропорциональна содержанию β-оксипропионил-КоА в смеси опыта. Фермент определяют при помощи калибровочной кривой, которую следует заново определять для каждого препарата фермента с 0,02—0,15 *мл* раствора β-оксипропионил-КоА (2).

[1] Раствор готовят по Vagelos P. a. Earl M. (J. Biol. Chem, 1959, 234, 2272) и затем разводят водой до 10^{-3} *М*. Относительно построения калибровочных кривых см. [53[.

Источники ошибок. Примененный здесь (см. ниже) пятикратно очищенный препарат фермента загрязнен малонилсемиальдегид-КоА в малонил-КоА. Поэтому можно применять только такое количество фермента, чтобы наступило оптимальное изменение экстинкции.

β-оксибутирил-КоА реагирует как β-оксипропионил-КоА. β-оксипропионилпантетеин дает по сравнению с дериватом КоА очень незначительную реакцию.

Получение β-оксипропионил-КоА-дегидрогеназы[1]. Фермент экстрагируют из Clostridium kluyveri посредством калифосфатного буферного раствора (раствор 4) при 0°. Приемы очистки включают: осаждение протаминсульфата; фракционирование посредством сульфата аммония (насыщение от 0,65 до 0,95%) и диализ.

Попытки очистить фермент далее (например, фракционированием посредством растворителей, адсорбцией гелем, осаждением кислотой, хроматографией на ДЕАЕ-целлюлозе) до сих пор не удавались.

Фермент по сравнению с сырым экстрактом обогащен в 5 раз. Он имеется в виде раствора в 0,01 *M* фосфатном буфере (pH 7,5). Точность метода 7%.

Определение *L*-(+)-β-оксибутирил-КоА [18]

Принцип. *L*-(+)-β-оксибутирил-КоА, промежуточный продукт распада жирных кислот, окисляется в присутствии фермента β-оксиацилдегидрогеназы посредством никотинамидадениндинуклеотида (НАД) в ацетоацетил-КоА:

$$(1)\quad CH_3-\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}}-CH_2-CO\sim SKoA + НАД^{+} \rightleftarrows$$

$$\xrightleftharpoons{\beta\text{-оксиацилдегидрогеназа}} CH_3-\underset{\displaystyle O}{\underset{\|}{C}}-CH_2-CO\sim S\,KoA + НАД\text{-}H + H^{+}$$

Как при всех превращениях, связанных с НАД, и здесь равновесие зависит от pH и может быть сдвинуто посредством увеличения щелочности среды в сторону образования карбонильного соединения. При значениях pH выше 8,5 смещение равновесия усиливается благодаря диссоциации энола; оно делает возможным количественное дегидрирование β-оксибутирил-КоА. В качестве величины измерения служит абсорбция при 340 *ммк* образующегося при реакции НАД-H_2.

Реактивы. Все реактивы готовят на дистиллированной деионизованной воде: 1) однозамещенный фосфат калия (0,2 *M* раствор): 2,722 *г* KH_2PO_4 растворяют в дистиллированной воде и доводят объем раствора до 100 *мл*; 2) раствор едкого калия (при-

[1] Относительно деталей см. источник в сноске на стр. 101.

близительно 8 *М*): 45 *г* едкого калия растворяют при охлаждении в дистиллированной воде, объем доводят до 100 *мл*; 3) бикарбонат калия (приблизительно 1 *М* раствор): 10 *г* $KHCO_3$ растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*; 4) трис-буферный раствор (около 0,5 *М*, pH 9,5): 12,1 *г* триса растворяют в 150 *мл* воды, смешивают с 0,35 *мл* концентрированной соляной кислоты, доливают дистиллированной водой до 200 *мл*; 5) хлорная кислота (приблизительно 4 *М* раствор): 35 *мл* 70%-ной кислоты разбавляют дистиллированной водой до 100 *мл*; 6) этилендиаминтетраацетат (0,1 *М* раствор): 1,86 *г* динатриевой соли растворяют в дистиллированной воде и объем доводят до 50 *мл*; 7) никотинамидадениндинуклеотид (0,01 *М* раствор НАД): 7,4 *мг* НАД растворяют приблизительно в 0,5 *мл* дистиллированной воды, нейтрализуют несколькими каплями раствора бикарбоната калия (раствор 3) и доливают дистиллированной воды до 1 *мл*; 8) β-оксиацилдегидрогеназа[1] ОАДГ (3 *мг* белка/*мл*). Соответственно разводят водой, в которую был добавлен этилендиаминтетраацетат (0,05 *мл* раствора на 1 *мл*).

β-оксибутирил-КоА так же стабилен, как ацетоацетилкофермент А, однако легче омыляется щелочью. Растворы НАД сохраняются много недель при 0° (лучше замороженные в холодильнике глубокого охлаждения). Остальные растворы сохраняют в холодильнике во избежание роста микроорганизмов, и их можно применять в течение длительного времени. Для буферного раствора и щелочных растворов применяют полиэтиленовые бутыли (стеклянные нежелательно).

Т е х н и к а. *Подготовка исследуемого материала* — см. стр. 93 «Определение ацетил-КоА». Требуются растворы от 1 до 3 (см. выше).

Получение деионизованной воды[2]. Наилучшими катионитами оказались марки СБС и СБСР, выпускаемые Химико-технологическим институтом им. Д. И. Менделеева (Москва). Они обладают наивысшей адсорбционной способностью и сами почти не растворяются в воде.

Освобожденную от катионов воду пропускают через другой адсорбент-анионит, задерживающий кислоты и растворимые органические вещества. Для этой цели применяют аниониты ЭДЭ-10 и ПЭ-9, выпускаемые Ленинградским институтом прикладной химии.

Специальные приборы для получения деминерализованной воды контролируются с учетом потребности лаборатории или предприятия.

Материалом для колонок служат политены — хлорвинил, плексиглас, полистирол, а также пластмасса и стекло. Колонки конструируются различной емкости: от 1 до 100 *л*. Ионообменный аппарат, колонки которого вмещают по 60 *кг* катионита и анионита, позволяет получить в час около 300 *л* деминерализованной воды. Для получения 1—2 *л* воды в час достаточны колонки емкостью в 1—2 *л*.

---

[1] Получение ОАДГ см.: S t e r n J. Bioch. Bioph. Acta, 26, 448, 1957,

[2] Ф. В. З а й к о в с к и й. Вопросы питания, № 6, 1954, 42.

Перед эксплуатацией адсорбентов в колонке предварительно производят очистку их от растворимых примесей. На дно колонки помещают слой крупного кварца или другого инертного материала, а затем слой более мелкого кварца. Нужным количеством катионита наполняют колонку почти доверху. Катионит промывают в течение дня 5%-ным раствором соляной кислоты и затем водой.

Анионита обычно загружают в полтора раза больше, чем катионита. Анионит промывают сначала 1%-ным раствором соляной кислоты, а затем 2%-ным раствором едкого натра или 5%-ным раствором соды.

После этого через систему колонок катионит — анионит пропускают водопроводную воду, которая освобождается в этой системе от органических солей и органических веществ и собирается в приемник — стеклянные бутыли.

Постановка опыта. При pH 9,5 анализируемой смеси ацетилмеркаптаны уже значительно гидролизуются. Поэтому нужно работать с такими высокими активностями фермента, чтобы дегидрирование заканчивалось в 1—2 минуты. Время пребывания β-оксибутил-КоА в щелочной среде до начала реакции также должно быть сокращено до минимума; поэтому раствор деривата кофермента А вносят в смесь опыта последним и работают как можно быстрее до начала реакции. После окончания реакции при помощи индикаторной бумаги проверяют, чтобы значение pH было не ниже 9. Если же оно менее 9, то раствор деривата КоА содержал слишком много буферных веществ. Тогда в предварительном опыте определяют количество 0,1 н. КОН, которое необходимо для поддержания требуемого значения pH в реакционной смеси. Это количество КОН вносят в смесь (опыт) перед ферментом.

Измерения ведут при 340, 334 и 366 *ммк* при комнатной температуре. Толщина слоя 1 *см*; объем анализируемой жидкости 2 *мл*. Последовательно отмеривают пипеткой в кювету (в *мл*):

Трис-буферный раствор (4)	0,70
Раствор ЭДТА (6)	0,04
Раствор НАД (7)	0,05
Раствор пробы	До 1,20 (содержащий 0,015—0,2 *мкмоля* β-оксибутирил-КоА)
Вода	До 1,99 *мл*

Хорошо перемешивают, измеряют начальную экстинкцию E_1 и начинают реакцию добавлением 0,01 *мл* раствора ОАДГ (8) около 200 единиц. Когда увеличение экстинкции приостанавливается (экстинкция постоянная дольше 1 минуты), измеряют конечное значение E_2.

Вычисление. При объеме анализируемой жидкости 2 *мл* и толщине слоя 1 *см* количество *L*-(+)-β-оксибутирил-КоА во всей пробе равно: после измерения при 340 *ммк*

$$0,322 \cdot \Delta E \cdot \frac{V}{v} = \text{мкмолей};$$

после измерения при 334 *ммк*

$$0{,}341 \cdot \Delta E \cdot \frac{V}{v} = \text{мкмолей};$$

после измерения при 366 *ммк*

$$0{,}607 \cdot \Delta E \cdot \frac{V}{v} = \text{мкмолей}.$$

V—объем всего раствор апробы, *мл*, v—аликвота этого раствора, внесенная в смесь опыта, *мл*, $\Delta E = E_2 - E_1$, E-коэффициент экстинкции НАД-H_2. Для 340 *ммк* $E = 6{,}22$; для 344 *ммк*—5,87; для 366 *ммк*—3,30 *см²/мкмоль*. *Пример*. 10 *мкмолей* КоА превращаются β-бутиролактоном в β-оксибутирил-КоА. Объем нейтральной жидкости был 3,2 *мл*. Для определения было взято 0,05 *мл*. Измерение ведут при длине волны 366 *ммк*. $E_1 - 0{,}117$. Добавлено ОАДГ, содержащего 100 единиц. Через 2 мин.: $E_2 = 0{,}243$; $\Delta E = 0{,}126$. Конечное значение pH 9,2—9,3.

$$0{,}607 \cdot 0{,}126 \cdot \frac{3{,}2}{0{,}05} = 4{,}9 \text{ мкмолей } L\text{-}(+)\text{-}\beta\text{-оксибутирил-КоА во всей пробе.}$$

С 0,08 *мл* раствора оксибутирил-КоА получено, соответственно

$$E_1 = 0{,}121;\ E_2 = 0{,}322;\ \Delta E = 0{,}201$$

$$0{,}607 \cdot 0{,}201 \cdot \frac{3{,}2}{0{,}08} — 4{,}88 \text{ мкмолей } L\text{-}(+)\text{-}\beta\text{-оксибутирил-КоА во всей пробе.}$$

Источники ошибок. Присутствие в анализируемом материале β-оксиацилдегидрогеназы (см. стр. 103) и β-кетоацилтиолазы (см. стр. 95) благоприятствует определению β-оксибутирил-кофермента А, так как комбинация обоих ферментов позволяет работать при менее щелочных значениях pH (например, при pH 8). Для этого необходимо добавлять меркаптан (кофермент А, пантетеин, NS-диацетил-цистеамин) в стехиометрическом соотношении.

Ингибирующе могут действовать некоторые сложные тиоловые эфиры β-оксибутирила и более высокие гомологи β-оксибутирил-КоА.

β-оксиацилдегидрогеназа не очень специфична в отношении меркаптановых компонентов. Наряду с β-оксибутирил-КоА дегидрируются также и соединения β-оксибутирила с пантетеинфосфатом, пантетеином, NS-диацетилцистеамином и некоторыми другими меркаптанами. Кроме того, реагируют дериваты кофермента А всех более высоких гомологов L-(+)-β-оксимасляной кислоты до приблизительно C_{20}. Однако имеется высокая специфичность в отношении группировки β-оксиацилмеркаптанов $R\text{-}CH(OH) - CH_2 - CO - S - R'$: ни дериваты α-оксиацила, ни свободные кислоты или первичные или вторичные алкоголи не дегидрируются. Так же строго избирательна активность фермента в отношении стереоизомеров. Дегидрируются только дериваты КоА L-(+)-β-оксикислот и только эта форма образуется при гидрировании ацетоацетил-КоА.

По этой причине полученный из КоА и β-бутиролактона β-оксибутирил КоА реагирует только на 50%. В то время как ОАДГ из овечьей печени работает только с НАД, фермент из свиного сердца может работать и с НАДФ в качестве акцептора водорода (соотношение скорости НАД : НАДФ = 10 : 1).

Другие методы определения β-оксибутирил-КоА [19] (КФ 5.1.2.3)

Определение становится более чувствительным, когда комбинируют ферменты β-оксиацилдегидрогеназу [1], β-кетоацилтиолазу [2], *L*-малатдегидрогеназу [3] и конденсирующий фермент; на моль *L*-(+)-β-оксибутирил-КоА гидрируются 3 моля НАД:

(2) *L*-(+)-β-оксибутирил-КоА + 2 *L*-малат$^{2-}$ + 3 НАД$^{+}$ + $2H_2O$ →
→ 2 цитрат$^{3-}$ + HS-КоА + 3 НАД-Н + $5H^{+}$.

Вообще говоря, большой расход ферментов вряд ли может быть оправдан этим преимуществом. То же относится и к составу смеси опыта, в которой в присутствии ОАДГ, β-кетоацетилтиолазы, ариламинацетилазы, НАД и каталитических количеств кофермента А (или пантетеина) ацетилируется *n*-нитроанилин.

(3) *L*-(+)-β-оксибутирил-КоА + 2 *n*-нитроанилин + НАД$^{+}$ →
→ 2 *n*-нитроацетанилид + HS-КоА + НАД-Н + H^{+}.

Если отсутствуют ингибирующие вещества, особенно тиоловые сложные эфиры, то можно применять и неферментативные способы определения. Точность метода 5%.

Определение кротонил-кофермента А [20, 21, 22]

Принцип. При расщеплении жирных кислот с четным числом углеродных атомов путем β-окисления в конце концов получается ацил-кофермент А, представляющий собой продукт конденсации КоА с кислотой, состоящей из 4 углеродных атомов, т. е. масляной кислотой (бутирил-КоА). Бутирил-КоА в свою очередь подвергается β-окислению с образованием кротонил-КоА.

Дальнейшее превращение ненасыщенного соединения ведется через *L*-(+)-β-оксибутирил-КоА в ацетоацетил-КоА. Посредством комбинации реакции гидратирования с реакцией дегидрирования можно определить кротонил-КоА.

(1) CH_3—CH = CH—CO ~ S-КоА +
+ H_2O ⇄ CH_3—CH(OH)—CH_2—CO ~ S-КоА

---

[1] КФ 1.1.1.35.
[2] КФ 2.3.1.16.
[3] КФ 1.1.1.37.

$$(2)\quad CH_3{-}CH(OH){-}CH_2{-}CO \sim S\text{-}KoA + НАД^+ \rightleftarrows$$
$$\rightleftarrows CH_3{-}CO{-}CH_2{-}CO \sim S\text{-}KoA + НАД\text{-}H + H^+$$

$$(3)\quad CH_3{-}CH = CH{-}CO \sim S\text{-}KoA + H_2O + НАД^+ \rightleftarrows CH_3{-}CO{-}CH_2{-}CO \sim$$
$$\sim S\text{-}KoA + НАД\text{-}H + H^+$$

Необходимые для осуществления этих реакций ферменты кротоназа [1] и β-оксиацилдегидрогеназа (ОАДГ) [2] были получены в кристаллическом виде, прописи для их получения хорошо воспроизводимы. Константа равновесия реакции с участием кротоназы (1) равна $K = 6{,}18 \cdot 10^{-2}$ 1/*моль*. Измеряют увеличение абсорбции НАД-H_2 при длине волны 340 *ммк*.

Р е а к т и в ы: 1) однозамещенный фосфат калия (0,2 *M* раствор): 2,722 *г* KH_2PO_4 растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*; 2) двузамещенный фосфат натрия (0,2 *M* раствор): 3,561 *г* $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ растворяют в дистиллированной воде и объем доводят до 100 *мл*; 3) раствор едкого калия (около 8 *M*): 45 *г* едкого калия при охлаждении растворяют в дистиллированной воде и объем доводят до 100 *мл*; 4) бикарбонат калия (приблизительно 1 *M* раствор): 10 *г* $KHCO_3$ растворяют в дистиллированной воде и объем доводят до 100 *мл*; 5) трис-буферный раствор (около 0,5 *M*, pH 9,5): 12,1 *г* триса растворяют в 150 *мл* воды, смешивают с 0,35 *мл* концентрированной соляной кислоты и доливают дистиллированной водой до 200 *мл*; 6) хлорная кислота (приблизительно 4 *M* раствор): 35 *мл* 70%-ной кислоты разводят дистиллированной водой до 100 *мл*; 7) этилендиаминтетраацетат (0,1 *M* раствор): 1,86 *г* ЭДТА-$Na_2H_2 \cdot 2H_2O$ растворяют в дистиллированной воде и объем доводят до 50 *мл*; 8) фосфатный буферный раствор (0,02 *M*, pH 7,4, 0,003 *M* ЭДТА): 4 *мл* раствора KH_2PO_4 (1) + 16 *мл* раствора Na_2HPO_4 (2) + 0,6 *мл* раствора ЭДТА смешивают и доливают свободной от CO_2 (прокипяченной) дистиллированной водой до 200 *мл*; 9) никотинамидадениндинуклеотид (около 0,01 *M* раствор НАД): 7,4 *мг* НАД растворяют приблизительно в 0,5 *мл* воды, нейтрализуют несколькими каплями раствора $KHCO_3$ (4) и доливают дистиллированной водой до 1 *мл*; 10) β-оксиацилдегидрогеназа (см. стр. 103) — ОАДГ (3 *мг* белка на 1 *мл*): основную взвесь разводят дистиллированной водой, к которой была добавлена ЭДТА — 0,05 *мл* раствора (7); 11) кротоназа (см. стр. 109) — 5 *мкг* белка на 1 *мл* — соответственно разводят фосфатным буферным раствором (8).

Концентрированные и разведенные растворы обоих ферментов сохраняются при 0° или замороженными долгое время без существенных потерь активности. Частое оттаивание и замораживание растворов вредно. Кротонил-кофермент А в растворе также стабилен, как и другие соединения ацил-КоА, однако стабильность сложных тиоэфиров α, β-ненасыщенных кислот в щелочной среде значительно больше, чем стабильность других ацилмеркаптанов. НАД

[1] Кротоназа (Еноил-КоА гидратаза); КФ 4.2.1.17.
[2] КФ 1.1.1.35.

в водном нейтральном растворе при 0° или замороженный устойчив в течение нескольких недель. Все остальные растворы стабильны длительное время, поскольку сохранение в холодильнике препятствует росту бактерий. Для буферного и щелочных растворов применяют полиэтиленовые бутыли.

Т е х н и к а. *Подготовка исследуемого материала* (см. определение ацетил-КоА, стр. 93). Необходимы растворы 3 и 6 (см. выше).

Постановка опыта. Продолжительность реакции и время нахождения кротонил-кофермента А в щелочном, подлежащем измерению растворе должны быть доведены до минимума (за счет высоких активностей фермента, добавление субстрата проводят непосредственно перед началом реакции, быстрая работа!).

Так как превращение кротонил-КоА является количественным только при pH 9, после окончания реакции убеждаются посредством индикаторной бумаги в том, что значение pH смеси опыта не снизилось. Если бы это произошло, то значит раствор кротонил-КоА содержал слишком много буферных веществ; определяют количество 0,1 н. раствора КОН, которое нужно для восстановления требуемого значения pH и повторяют опыт с добавлением измеренного количества 0,1 н. раствора КОН, перед тем как доводить до конечного объема водой. Измерение ведут при 340, 334 или 366 *ммк*. Толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 2 *мл*, температура комнатная.

Последовательно отмеривают пипеткой в кюветы (в *мл*):

Трис-буферный раствор (5)	0,70
Раствор ЭДТА (7)	0,03
Раствор НАД (9)	0,05
Раствор ОАДГ (10)	0,01
Проба	До 1,20
Вода	До 2,0

Наблюдают экстинкцию до наступления постоянного значения (минимум 30 секунд). Измеряют начальную экстинкцию E_0. Реакцию начинают внесением при помешивании 0,005 *мл* раствора (11) кротоназы (см. стр. 107) с содержанием около 35 единиц.

Если увеличение экстинкции приостановилось (постоянное значение в течение более 1 минуты), то измеряют конечное значение E_1.

Вычисление. При 2 *мл* объема анализируемого материала и толщине слоя 1 *см* имеем

при длине волны 340 *ммк*:

$$0{,}322 \cdot \Delta E \frac{V}{v};$$

при длине волны 334 *ммк*:

$$0{,}341 \cdot \Delta E \frac{V}{v};$$

при длине волны 366 *ммк*:

$$0{,}607 \cdot \Delta E \frac{V}{v}.$$

V — объем всего раствора пробы, *мл*, v — аликвота этого раствора, внесенная в опыт, *мл*.

$$\Delta E = E_1 - E_0.$$

E — коэффициент экстинкции для НАД-H_2. Значения: для 340 *ммк* — 6,22; для 334 *ммк* — 5,87; для 366 *ммк* — 3,3 *см²/мкмолей*.

Пример. 20 *мкмолей* кофермента А были переведены ангидридом кротоновой кислоты в кротонил-КоА. Объем нейтрального раствора был 5,4 *мл*. Для определения было взято 0,07 *мл*. Измерение вели при 366 *ммк*. $E_0 = 0{,}106$. После добавления кротоназы экстинкция повысилась (за 80—90 секунд) до $E_1 = 0{,}398$ (постоянное значение свыше 1 минуты). Конечное значение pH было 9,3;

$$\Delta E = 0{,}398 - 0{,}106 = 0{,}292$$

$0{,}607 \cdot 0{,}292 \dfrac{5{,}4}{0{,}07} = 13{,}65$ *мкмолей* кротонил-КоА во всем растворе пробы. При внесении в опыт 0,05 *мл* кротоназы ε_0 было 0,102.

$E_1 = 0{,}312$. $\Delta E = 0{,}210$; Количество кротонил-КоА во всем растворе пробы: 13,73 *мкмолей*.

Реакция кофермента А с ангидридом кротоновой кислоты протекает, таким образом, в данном случае не количественно.

Источники ошибок. Препараты фермента не должны содержать β-кетоацетилтиоазы. Присутствие в пробе β-оксибутирил-КоА, который тоже привел бы к восстановлению НАД, обнаруживается по увеличению экстинкции перед началом реакции с кротоназой. После того как значение E_0 станет постоянным, точность определения кротонил-КоА не нарушается. Нарушающе действуют соединения, реагирующие как с кротоназой, так и с β-оксиацилдегидрогеназой (кротоназа очень специфична для тиолов). Сюда относятся в первую очередь дериваты α, β- (и β, γ-) ненасыщенных жирных кислот. Меркаптаны соединяются по месту двойных связей с образованием α, β-эноил-тиоловых сложных эфиров. Образующиеся тиоловые эфиры не претерпевают превращений. Поэтому при работе с кротонил-КоА следует избегать добавления SH-соединений.

β-оксиацилдегидрогеназа (см. стр. 103) и кротоназа активны по отношению ко всем КоА дериватам α, β-ненасыщенных жирных кислот. Продуктами и субстратами обратимого гидратирования являются соединения L-(+)-β-оксиацил-КоА. В активности кротоназы (см. ниже) по отношению к изомерам положения (Δ^α и Δ^β) и цис-транс-изомерам изокротонил- и кротонил-КоА находят количественные различия. Гидратируются также β-метилкротонил или сорбил- и β-метилглютаконил-КоА.

Кротоназа обладает высокой степенью специфичности в отношении тиоловых компонентов. Ни N-ацетил-цистеамин, ни глютатион-дериваты кротоновой кислоты не гидратируются. Кротонил-пантетеин реагирует с кристаллическим ферментом лишь крайне медленно; однако в присутствии КоА кротоназа может действовать для этого субстрата в качестве тиолтранскротонилазы.

Другие методы определения кротонил-КоА [23, 24]

Сложные тиоловые эфиры кротонила обладают характерным спектром в две полосы с максимумом при длине волны 225 и 263 *ммк* ($E = 1{,}06 \cdot 10^7$ и $6{,}5 \cdot 10^6$ *см²/моль*). Уменьшение абсорбции между 260 и 270 *ммк*, связанное с гидратированием, может служить для определения кротонил-КоА, если позаботиться о полном удалении из равновесной системы образующегося β-оксибутирил-КоА. Для проведения дегидрирования посредством НАД в данном случае необходимы ферменты β-оксиацилдегидрогеназа и алкогольдегидрогеназа [1], так же как и ацетальдегид. Другая возможность определения кротонил-КоА лежит в его гидрировании в бутирил-КоА с НАДФ-H_2 в присутствии фермента из микросом печени. Ни один из этих методов не обладает преимуществами против описанных здесь.

Приложение. *Получение кротоназы* (см. стр. 107) [25]. Исходный материал — глубоко замороженная печень рогатого скота. Приемы переработки:

1. Экстракция посредством раствора $KHCO_3$ и цистеина при pH 8,2.
2. Нагревание до 55° при pH 5,5.
3. Осаждение ацетоном при — 5°. Растворение осадка в буферном растворе с pH 7,4 (0,003 *M* ЭДТА) и диализ.
4. Фракционирование сульфатом аммония между 40 и 65% насыщения. Растворение осадка в 0,02 *M* буферном растворе фосфата калия с pH 7,4 (0,003 *M* ЭДТА и 0,001 *M* глютатиона). Диализ.
5. Кристаллизация прибавлением 0,1 объема этанола к диализированному раствору. Дважды перекристаллизовывают. Точность метода около 4%.

Определение бутирил-КоА и КоА-высших насыщенных жирных кислот [26]

(Бутирил-КоА 1.3.99.2.)

Определение активности дегидрогеназ при помощи окислительно-восстановительных красителей в качестве акцепторов водорода было разработано Тунбергом. Этот метод может быть применен также для определения дериватов КоА насыщенных жирных кислот при помощи «общей ацил-КоА-дегидрогеназы (ОАД)» [2] и электронпереносящих флавопротеинов (ЭТФ).

Принцип. ОАД и ЭТФ катализируют перенос водорода от ацил-КоА на дихлорфенолиндофенол с образованием α, β-дегидроацил-КоА и лейкодихлорфенолиндофенола.

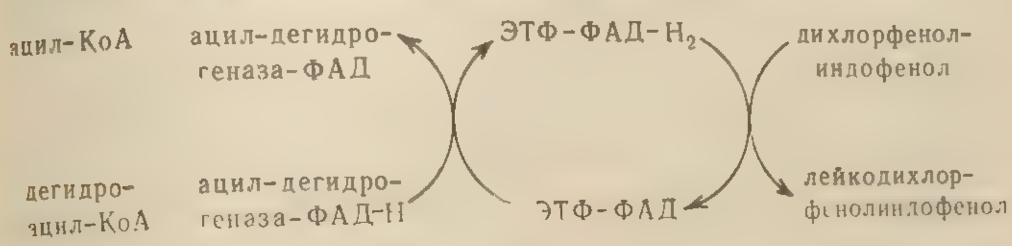
$$\begin{gathered}R{-}CH_2{-}CH_2{-}CO - S - КоА + \text{дихлорфенолиндофенол} \rightarrow \\ \rightarrow R - CH{=}CH{-}CO{-}S{-}КоА + \text{лейкодихлорфенолиндофенол}. \qquad (1)\end{gathered}$$

---

[1] КФ 1.1.1.1.
[2] КФ 1.3.99.3.

Редокс-потенциал для пар бутирил-КоА/кротонил-КоА ($R - CH_3$); и дихлорфенолиндофенол/лейкодихлорфенолиндофенол составляет $E_0^1 = -0{,}015$ и $E_0^1 = +0{,}22$. Реакция практически полностью протекает слева направо. При избытке дихлорфенолиндофенола ацил-КоА количественно превращается в дегидроацил-КоА. По обесцвечиванию красителя можно заключить о введенном количестве ацил-КоА.

Печень содержит три ацилдегидрогеназы, максимумы активности которых проявляются в комплексе бутирил-КоА, каприл-КоА и лаурил-КоА. От ацилдегидрогеназы водород в первую очередь переносится на флавинадениндинуклеотид (ФАД) посредством ЭТФ:



Для определения ацил-кофермента А, таким образом, нужно иметь ЭТФ , а также ацилдегидрогеназу, специфическую для определяемого деривата КоА. Особенно пригодной оказалась для этого ОАД, которая специфична для дериватов КоА насыщенных кислот от C_4 до C_{16}.

Р е а к т и в ы. Препарат ЭТФ должен проявлять специфическую активность в 3,6 *ед/мг*[1]. ОАД должна быть очищена до специфической активности 5,6 *ед/мг*, измеренной с бутирил-коферментом А в качестве субстрата.

1) фосфатный буферный раствор $^1/_{15}M$, pH 7,0: 7,12 *г* $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ и 3,54 *г* KH_2PO_4 растворяют в дистиллированной воде и после растворения доводят объем до 1000 *мл*; 2) раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола (0,3 *мг/мл*, pH 7,0): 3,0 *мг* соли натрия красителя растворяют в буферном растворе (1) до 10 *мл*; 3) йод/йодистый калий: 1,8 *г* йодистого калия растворяют в небольшом количестве воды в колбе емкостью 1000 *мл*, прибавляют 1,24 *г* йода, колбу закрывают, встряхивают, пока не растворится весь йод. В случае необходимости прибавляют еще несколько кристаллов KJ. Доливают дистиллированной водой до 1000 *мл*. Раствор хранят в коричневой бутыли; 4) «электрон, переносящий флавопротеин» ЭТФ (12 *мг* белка на 1 *мл*): взвесь фермента (приготовление см. стр. 113) разводят фосфатным буферным раствором (1) до содержания 12 *мг/мл*; 5) «Ацил-КоА дегидрогеназа» ОАД (10 *мг* белка на 1 *мл*): взвесь фермента (приготовление см. стр. 113) 30—40 *мг* белка на 1 *мл* разводят соответственно фосфатным буферным раствором (1).

[1] Под 1 единицей подразумевается такое количество фермента, которое снижает экстинкцию 2,6-дихлорфенолиндофенола в 0,5 *мл* раствора за 1 мин. при 600 *ммк* на 0,100.

Раствор дихлорфенолиндофенола еженедельно готовят свежий. Препараты фермента сохраняются при — 15° около 6 месяцев. Дериваты КоА насыщенных жирных кислот сохраняются в виде сухого порошка при 0° в эксикаторе почти неограниченное время. Указания о водных растворах относятся только к стабильности связей сложных тиоэфиров. В дериватах *S*-ацил-*N*-ацетил-цистеамина низших жирных кислот связь сложных тиоэфиров за несколько минут гидролизуется 0,1 н. раствором КОН. С увеличением длины цепи жирной кислоты увеличивается стабильность связи сложных тиоэфиров. При pH от 3 до 4 связь сложных тиоэфиров очень стабильна. При pH от 3,5 до 5 ацетил-КоА можно нагревать 15 минут до 100° без существенных потерь. Поэтому водные растворы дериватов КоА следует сохранять слабокислыми или при низких температурах (от 0 до — 15°).

Техника. *Подготовка исследуемого материала.* Если пробы содержат большие количества восстанавливающих агентов, то перед определением их следует окислить йодом. Во избежание избытка йода сначала определяют на аликвоте необходимое количество йода и затем, отлив предварительно от пробы небольшую часть, титруют ее йодом до ясного изменения в желтый цвет. Затем в нее вливают отлитую часть, и проба вновь обесцвечивается.

Постановка опыта. Измерение ведут при 600 *ммк* при толщине слоя 1 *см*; объем анализируемой жидкости 1,02 *мл*. Измерение ведут против сравнительной кюветы.

Последовательно отмеривают пипеткой в кюветы:

Опытная кювета	Сравнительная кювета
0,93—0,94 *мл* буферного раствора (1)	0,95 *мл* буферного раствора (1)
0,05 *мл* раствора дихлорфенолиндофенола (2)	0,05 *мл* раствора дихлорфенолиндофенола (2)
0,02—0,01 *мл* пробы	

Дают постоять около 5 минут, пока не будет достигнуто постоянное значение экстинкции E_1; затем в обе кюветы вносят 0,01 *мл* взвеси ЭТФ (4) и 0,01 *мл* взвеси ОАД (5). Все это перемешивают и следят за временем падения экстинкции в кювете опыта. Абсорбцию сравнительной кюветы во время опыта устанавливают на постоянное значение.

После достижения постоянного конечного значения в кювете опыта (приблизительно через 5 минут) измеряют E_2.

Вычисление. Содержание ацил-КоА в пробе вычисляют по уравнению

$$\frac{\Delta E \cdot V}{E \cdot d} = \textit{мкмолей} \text{ ацил-КоА (смесь опыта)};$$

при этом ΔE — измеренное уменьшение экстинкции ($\Delta E = E_1 - E_2$), V — объем смеси опыта в кювете, *мл*, E — коэффициент экстинкции:

15,6 *см²/мкмолей* [1] при 600 *ммк* и 14,3 *см²/мкмолей* при 578 *ммк*, *d* — толщина слоя, *см*.

Источники ошибок. Перед анализом дериватов КоА, которые были образованы посредством обмена HS-КоА с ангидридами кислот, нужно проверить, был ли примененный препарат КоА свободен от глютатиона. Производное S-ацилглютатиона, образующееся при обмене препаратов КоА, содержащих глютатион, гидролизуется посредством деацилаз (которые тоже содержатся в ферментном препарате) с образованием глютатиона. Последний обесцвечивает дихлорфенолиндофенол и поэтому дает слишком большие значения.

Приложение. *Получение ферментов ОАД и ЭТФ* [27, 28]. Активность обоих ферментов измеряют способом, который описан для определения дериватов ацил-КоА. Мерой активности фермента является скорость обесцвечивания красителя. Так как оба фермента вместе осуществляют перенос водорода субстрата на акцептор, то правильно измерена может быть лишь активность того фермента, который ограничивает скорость общей реакции. Например, чтобы иметь возможность проследить за очисткой ОАД, следует при определениях активности добавлять в избытке ЭТФ. То же относится к выделению и ЭТФ. Из этого вытекает необходимость сначала «вслепую» обогатить один из двух ферментов.

ЭТФ. 100 *г* ацетонового порошка из митохондриев свиной печени экстрагируют трис-ацетатным буферным раствором pH 7,5; осаждают в экстракте неактивный белок цинк-лактатом; фильтруют, затем посредством добавления твердого сульфата аммония до 30, 50, 65 и 85% насыщения осаждают 4 фракции белка. Фракции между 50 и 65%, так же как и между 65 и 85% насыщения соединяют, диализируют и снова осаждают сопровождающий неактивный белок посредством добавления цинк-лактата; фильтруют; фильтрат фракционируют при —15° алкоголем (10, 16 и 40%-ным). ЭТФ появляется в третьей фракции (16—40%). После диализа белковый раствор снова фракционируют твердым сульфатом аммония. Фракцию 65—90% насыщения при pH 8,1 фракционируют сульфатом аммония. При 70—75% насыщения получают препарат, который можно применять для определения.

ОАД. 300 *г* ферментного ацетонового порошка из митохондриев свиной печени экстрагируют фосфатным буферным раствором, центрифугируют, экстракт фракционируют твердым сульфатом аммония.

---

[1] Данные для коэффициента экстинкции дихлорфенолиндофенола колеблются между 16,0 и 19,0 *см²/мкмоль*. Приведенный здесь коэффициент экстинкции был определен на основании содержания *S*-ацила или аденина в очищенных дериватах КоА масляной, капроновой, каприловой, каприновой и пальмитиновой кислот. Хроматографически в этих препаратах нельзя было обнаружить загрязнений, абсорбирующих при 260 *ммк*. Для отношения между содержанием *S*-ацила, аденина и фосфата были установлены значения между 1 : 1 : 2,99 и 1 : 1,03 : 3,16. Независимо от длины цепи остатка жирной кислоты имелась линейная связь между содержанием аденина в дериватах КоА и значениями ΔE, определенными ферментативным методом.

Осадок между 55 и 65% насыщения диализируют, 2 минуты нагревают при 57°. Денатурированный белок отцентрифуговывают, в надосадочной жидкости осаждают сопровождающие протеины добавлением цинк-лактата. Фракционируют алкоголем, осадок сульфатом аммония фракционируют между 18 и 23%-ным алкоголем при pH 8,1. Детали см. Crane F. a. Beinert N., J. Biol. Chem., 1956, 218, 717. Точность метода около 5%.

Определение β-окси-β-метил-глютарил-КоА [29, 30]

(КФ 3.1.2.5)

Принцип. Для определения β-окси-β-метил-глютарил-кофермента А (ОМГ-КоА) используется его расщепление на ацетоацетат и ацетил-КоА посредством ОМГ-КоА-расщепляющего фермента (ОМГ-КоА РФ).

$$\text{ОМГ-КоА} \xrightleftharpoons{\text{ОМГ-КоА РФ}} \text{ацетоацетат} + \text{ацетил-КоА}. \qquad (1)$$

Равновесие находится полностью на стороне продуктов расщепления.

Путем комбинирования оптических методов для определения ацетил-КоА становится возможным измерение посредством соединенных оптических тестов. Ацетил-КоА определяют также и с малат-дегидрогеназой (МДГ) и ферментом, конденсирующим цитрат (ЦФ).

$$\text{Ацетил-КоА} + L\text{-малат}^{2-} + H_2O + \text{НАД}^+ \rightleftarrows \text{цитрат}^{3-} + \text{КоА} + \text{НАД-Н} + 2H^+.$$

Итоговое уравнение равновесия, таким образом, будет

$$\text{ОМГ-КоА} + L\text{-малат}^{2-} + H_2O + \text{НАД}^+ \rightleftarrows \text{цитрат}^{3-} + \text{ацетоацетат} + \text{КоА} + \text{НАД-Н} + 2H^+.$$

Измеряемой величиной служит увеличение экстинкции НАД-H_2 при 340, 366 и 334 *ммк*.

Реактивы: 1) трис-буферный раствор (около 0,5 *М*, pH 8,0): 60 *г* трис-оксиметиламинометана растворяют в дистиллированной воде до 500 *мл* и доливают 0,5 н. раствором HCl до 1000 *мл*; 2) хлористый магний (0,1 *М* раствор): 2,03 *г* $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ растворяют в дистиллированной воде и объем доводят до 100 *мл*; 3) тиогликолат (0,35 *М* раствор): 0,24 *мл* 80%-ной тиогликолевой кислоты растворяют приблизительно в 4 *мл* дистиллированной воды, нейтрализуют 1 н. раствором КОН и доливают дистиллированной водой до 10 *мл*. Ежедневно готовят свежий раствор; 4) *DL*-малат (0,1 *М* раствор): 1,341 *г* *DL*-яблочной кислоты растворяют в воде, нейтрализуют 1н. раствором КОН, доливают водой до 100 *мл*; 5) 0,02*М* раствор НАД[1]; 30 *мг* НАД растворяют в 1 *мл* дистиллированной воды, нейтрализуют 0,1 н. раствором КОН, доливают дистиллированной водой

[1] КФ 1.1.1.37.

до 2 *мл*; 6) малатдегидрогеназа — МДГ (около 10 *мг* белка на 1 *мл*); взвесь применяют неразведенной; кристаллизуется из свиных сердец: суспензия приблизительно 10 *мг* белка на 1 *мл* в 2,8 *М* растворе сульфата аммония; специфическая активность 10 000—50 000 *ед/мг*[1]. 7) фермент, конденсирующий цитрат — ЦФ (около 10 *мг* фермента на 1 *мл*). Взвесь применяют неразведенной; «Цитратконденсирующий фермент» (ЦФ) кристаллизуется из свиных сердец: суспензия приблизительно из 10 *мг* белка на 1 *мл* в 2,5 *М* растворе сульфата аммония; специфическая активность[2] около 4800 *ед/мл*. 8) ОМГ-КоА-расщепляющий фермент (около 2 *мг* белка на 1 *мл*). Раствор при необходимости разводят 0,05 *М* трис-буферным раствором (рН 7,5). «ОМГ-КоА-расщепляющий фермент» — из печени рогатого скота, около 2 *мг* белка на 1 *мл*. Пригодны препараты со специфической активностью[3] около 2000 *ед/мг* (выделение см. Приложение, стр. 117, [34] и [35]). Диализированные растворы при — 18° стойки в течение многих месяцев. Повторное же оттаивание и замораживание приводит к быстрой потере активности.

Техника. *Подготовка исследуемого материала.* Опытная смесь должна содержать не менее 0,2 *мкмолей* ОМГ-КоА. Следует избегать высокого содержания соли в пробе. Для осаждения белков анализируемого материала можно применять хлорную кислоту или трихлоруксусную кислоту (конечная концентрация 3%) при охлаждении на льду. Трихлоруксусную кислоту удаляют повторной экстракцией эфиром, свободным от перекиси. Затем выдувают остаточный эфир азотом и устанавливают (добавлением раствора KOH) в растворе рН 5. В растворах, очищенных от белка хлорной кислотой, осторожно, посредством раствора KOH, устанавливают рН 5, дают постоять 10 мин. на ледяной бане и декантируют от $KClO_4$.

ОМГ-КоА, как и все КоА, сложные тиоэфиры, чувствителен к окислителям (например, к перекисям эфиров, H_2O_2) и при щелочном значении рН легко гидролизуется (время полугидролиза ОМГ-КоА при 15° в 0,1 н. растворе NaOH 8 мин.). При рН от 4 до 5 (оптимально) и при 0° ОМГ-КоА устойчив несколько дней, при — 18° сохраняется практически неограниченное время.

Постановка опыта. Измерение ведут при длине волны 340, 366 или 334 *ммк*. Толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 1,80 *мл*; температура + 20—25°. Последовательно отмеривают пипеткой в кюветы: 0,40 *мл* трис-буферного раствора (1), 0,20 *мл* раствора $MgCl_2$ (2), 0,02 *мл* раствора тиогликолата (3), 0,05 *мл* раство-

---

[1] Единица активности измеряется в трис-буфере. 1 единица — это количество фермента, которое в испытуемой пробе объемом 3 *мл* при 340 *ммк* за 1 мин. изменяет экстинкцию на 0,010 [31].

[2] 1 единица активности — это количество фермента, которое в испытуемой пробе объемом 1,5 *мл* при 340 *ммк* за 1 мин. вызывает изменение экстинкции на 0,010.

[3] 1 единица активности — это количество фермента, которое в испытуемой пробе объемом 1,8 *мл* при 340 *ммк* за 5 мин. изменяет экстинкцию на 0,001.

ра малата (4), 0,05 *мл* раствора НАД (5), 1,00 *мл* пробы (при необходимости дополнительно прибавляется дистиллированная вода в количестве до 1 *мл*), 0,001 *мл* взвеси МДГ (6), 0,001 *мл* взвеси ЦФ (7).

Через 20 сек. измеряют начальную экстинкцию[1] E_0, затем начинают реакцию посредством добавления 0,8 *мл* раствора ОМГ-КоА-расщепляющего фермента (8) — около 300 единиц. Реакция заканчивается через 10—20 мин. Измеряют экстинкцию E_1; $E_1 - E_0 = \Delta E$.

Если препарат ОМГ-КоА-расщепляющего фермента заметно окрашен, то его собственная экстинкция должна определяться отдельно, в смеси, содержащей вместо пробы дистиллированную воду. E_0 следует поправить на это значение. В таком слепом опыте с примененными здесь препаратами фермента большей частью появляется реакция, которой можно пренебречь. Однако перед каждой серией опытов ее следует проверить.

Вычисление. Для объема анализируемой жидкости в 1,80 *мл* и толщине слоя 1 *см* количество ОМГ-КоА, содержащееся во введенном объеме пробы, составляет при измерении на длине волны 340 *ммк*:

$$\Delta E \cdot 0{,}289 = \textit{мкмолей}\ \text{МОГ-КоА};$$

при измерении на длине волны 366 *ммк*:

$$\Delta E \cdot 0{,}545 = \textit{мкмолей}\ \text{ОМГ-КоА};$$

при измерении на длине волны 334 *ммк*:

$$\Delta E \cdot 0{,}300 = \textit{мкмолей}\ \text{ОМГ-КоА};$$

При перечислении на *мкг* следует умножать на молекулярный вес ОМГ-КоА (911,1).

В той же смеси опыта может быть определен ацетил-КоА. Для этого следят за экстинкцией до и после добавления ЦФ до получения постоянства поглощения света. Вслед за этим может быть определен ОМГ-КоА посредством добавления ОМГ-КоА-расщепляющего фермента.

ОМГ-КоА расщепляющий фермент превращает только природные изомеры ОМГ-КоА, конфигурация которых соответствует конфигурации (+)-мевалоновой кислоты. Точность метода 3%.

Другие методы определения ОМГ-КоА [32, 33]

ОМГ-КоА может быть определен после воздействия ОМГ-КоА-расщепляющего фермента (уравнение 1) анализом ацетил-КоА с ариламинацетилазой (см. стр. 97) в качестве фермента индикатора (см. определение ацетил-КоА).

---

[1] Начальное равновесие дегидрирования малата устанавливается за несколько секунд.

Под влиянием свободного HS-КоА (≥1,01 *мкмолей* на опытную смесь) и соединения ацетил-КоА с длинной цепью, как, например, пальмитил-КоА (≥ 0,02 *мкмолей*), ацетилаза ариламина заметно ингибируется. Вследствие этого продолжительность опыта может значительно увеличиться.

П р и л о ж е н и е. Выделение фермента, конденсирующего цитрат [34]. Применяют следующие приемы:

1. Двукратная экстракция размолотых свиных сердец фосфатным буферным раствором.
2. Осаждение уксусной кислотой при pH 5,5.
3. Абсорбция на фосфатном геле кальция и элюирование.
4. Осаждение алкоголем.
5. Фракционирование сульфатом аммония между 50 и 60% или 60 и 70% насыщения.
6. Повторное фракционирование сульфатом аммония между 40 и 60% насыщения.
7. Кристаллизация и повторная кристаллизация.

Получение фермента расщепления ОМГ-КоА [35]. Применяют следующие приемы:

1. Приготовление ферментного сухого ацетонового порошка из печени рогатого скота.
2. Экстракция сухого порошка фосфатным буферным раствором.
3. Нагревание экстракта до 50° (20 мин.).
4. Фракционирование ацетоном при — 8°.
5. Осаждение побочных веществ раствором ацетата цинка.
6. Фракционирование сульфатом аммония между 0 и 50% насыщения. Детали см. [35].

Определение никотинамидадениндинуклеотида[1] [36] (НАД)

П р и н ц и п. НАД восстанавливают при помощи этанола и алкогольдегидрогеназы [2] в НАД-H_2:

$$\text{этанол} + \text{НАД}^+ \rightleftarrows \text{ацетальдегид} + \text{НАД-Н} + \text{H}^+$$

$$\text{Константа равновесия } K_{pH} = \frac{K}{H^+} = \frac{(\text{ацетальдегид})\cdot(\text{НАД-}H_2)}{(\text{этанол})\cdot(\text{НАД}^+)}$$

равна при 25° при pH 7 $K_7 = 10^{-4}$, при pH 8,8 $K_{8,8} = 10^{-2}$. Равновесие лежит, таким образом, в левой стороне уравнения.

Количественное восстановление НАД достигается при помощи: 1) щелочной реакции среды, 2) высокой концентрации этанола и 3) связыванием образующегося ацетальдегида семикарбазидом. Почти полное восстановление малых количеств НАД удается без семикарбазида при щелочном pH и высокой концентрации алкоголя. Пользуясь константой равновесия, можно вычислить, что при pH 8,8 и 0,5 *M* концентрации этанола, 0,1 *ммоля* НАД редуцируется

[1] Метод можно использовать и для анализа растительного материала.
[2] КФ 1.1.1.37.

в количестве 97% и 0,01 *ммоля* НАД — в количестве 99,7% при условии, что проба не содержит ацетальдегида и НАД-H_2. При экстракции хлорной кислотой НАД-H_2 разрушается кислотой. Используют пирофосфатный буфер, так как пирофосфат связывает комплекс ионов тяжелых металлов, которые могут ингибировать алкогольдегидрогеназу.

Реактивы: 1) хлорная кислота (0,6 н. раствор): 5,2 *мл* $HClO_4$ (уд. вес. 1,67) разбавляют бидистиллированной водой до 100 *мл*; 2) хлорная кислота (3 н. раствор): 26 *мл* $HClO_4$ (уд. вес. 1,67) разбавляют бидистиллированной водой до 100 *мл*; 3) двузамещенный фосфат калия (1 *М* раствор): 17,4 *г* K_2HPO_4 растворяют в бидистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*; 4) пирофосфатный буфер (0,1 *М* раствор, pH 8,8): 4,5 *г* $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$ и 0,5 *г* гидрохлорид-семикарбазида растворяют в бидистиллированной воде и объем доводят до 100 *мл*; 5) алкоголь-дегидрогеназа — АДГ (1,2 *мг* протеина на 1 *мл*): основную взвесь соответственно разбавляют 2,4 *М* раствором сульфата аммония. Суспензию АДГ (раствор 5) для каждого опыта готовят свежей из концентрированной основной взвеси. Она устойчива лишь в течение нескольких часов. Все остальные растворы, предохраненные от роста микроорганизмов, устойчивы в течение нескольких месяцев.

Техника. *Подготовка исследуемого материала*. НАД и НАДФ экстрагируют из животной ткани, крови и митохондрий хлорной кислотой. Концентрация хлорной кислоты в экстракционной смеси должна быть около 0,5 н. Для этого на 1 *г* ткани или 1 *мл* крови берут 5 *мл* 0,6 н. раствора $HClO_4$. Ткани в замороженном состоянии растирают в ступке в тонкий порошок. Центрифужные или маленькие стаканчики, содержащие раствор 0,6 н. хлорной кислоты (раствор 1), взвешивают и при сильном помешивании (магнитная мешалка) в них вносят замороженный порошок ткани, после чего заново взвешивают. Соотношение веса ткани к весу $HClO_4$ устанавливают приблизительно 1 : 5. Кровь впрыскивают из шприца прямо в раствор хлорной кислоты (1).

Суспензии митохондрий во избежание сильного разбавления освобождают от белка 3 н. раствором хлорной кислоты (2): при сильном помешивании на каждый 1 *мл* взвеси митохондрий добавляют 0,2 *мл* 3 н. раствора $HClO_4$. Для удаления белков центрифугируют в течение 5 мин. при 3000—5000 *g*; около 2 *мл* надосадочной жидкости осторожно отсасывают пипеткой, чтобы не захватить осадок белка, помещают в сосуд емкостью 10 *мл*, в который при охлаждении добавляют пипеткой 0,2 *мл* раствора K_2HPO_4 (3) и при интенсивном помешивании (магнитная мешалка) из тонкого капилляра 3 н. раствор KOH, чтобы довести pH до 7,2—7,4. Выпавший осадок $KClO_4$ отделяют центрифугированием из надосадочной жидкости, берут пипеткой пробы для измерения.

Измерение ведут при 340 или 366 *ммк*; толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой смеси 2,04 *мл*; комнатная температура. Измерение ведут против воздуха или воды.

В кювету последовательно отмеривают: 1,00 *мл* экстракта, 1,00 *мл* пирофосфатного буфера (4); 0,02 *мл* этанола, размешивают и отсчитывают экстинкцию E_1; затем начинают реакцию добавлением (при размешивании) 0,02 *мл* суспензии АДГ (раствор 5) и по истечении трех минут отсчитывают конечную экстинкцию E_2.

$$\Delta E = E_2 - E_1.$$

Вычисление:

$$\frac{\Delta E \cdot 2{,}04}{d \cdot \varepsilon}\left(1 + \frac{V_2}{v_1}\right)\left(1 + \frac{V_4 V_5}{V_3}\right)$$

мкмоли НАД на 1*мл* исследуемого материала,

где d — толщина слоя кюветы, *см*, ε — коэффициент экстинкции для НАД-H_2-*см*^{2}/*мкмоль*; при 340 *ммк* 6,22; при 366 *ммк* 3,30. V_1 — объем исследуемого материала (вес/плотность), V_2 — количество $HClO_4$, необходимое для осаждения белка, *мл*, V_3 — взятый после осаждения белков остаток, *мл*, V_4 — прибавленный раствор K_2HPO_4, *мл*, V_5 — количество раствора КОН, необходимого для нейтрализации, *мл*, 2,04 — объем пробы, *мл*.

Количество НАД в кювете $\frac{\Delta E \cdot 0{,}24}{d \cdot \varepsilon}$ умножают на фактор разведения, так что содержание НАД получают в единице объема исследуемого материала.

Так как плотности ткани и крови почти равны 1, вес (в *г*) и объем (в *мл*) практически одинаковы. Таким образом, НАД/*мл* $\approx$ $\approx$ НАД/*г*.

Источники ошибок. Препараты алкогольдегидрогеназы[1] из дрожжей содержат обычно в незначительном количестве НАДФ-специфичную алкогольдегидрогеназу. Можно не считаться с помехами, обусловленными ею, так как используют очень немного алкогольдегидрогеназы. Это дает возможность определять НАД в экстрактах, содержащих и НАДФ. Точность метода около 5%.

Определение восстановленного никотинамидадениндинуклеотида [36][2]

Принцип. Для определения НАД-H_2 принципиально можно использовать любую НАД-специфическую реакцию дегидрогеназы, при помощи которой НАД-H_2 окисляется полностью. Метод основан на катализируемом лактатдегидрогеназой[3] окислении НАД-H_2 пируватом:

$$\text{НАД-Н} + H^+ + \text{пируват} \xrightleftharpoons{\text{ЛДГ}} \text{НАД}^+ + \text{лактат} \qquad (1)$$

$$\text{Константа равновесия } K_{pH} = \frac{K}{(H^+)} = \frac{(\text{пируват})\cdot(\text{НАД-}H_2)}{(\text{лактат})\cdot(\text{НАД}^+)}$$

при 25° и pH 7 равна $K_7 = 2{,}9 \cdot 10^{-5}$.

---

[1] КФ 1.1.1.37.
[2] Метод можно использовать и для анализа растительного материала.
[3] КФ 1.1.1.27.

Равновесие реакции лежит, таким образом, в правой стороне, так что полное окисление НАД-H_2 достигается при количественно незначительном излишке субстрата.

Реактивы: 1) спиртовый раствор щелочи (0,5 н. КОН): 2,8 *г* КОН растворяют при смешивании с равным объемом этанола и бидистиллированной воды и по растворении объем доводят до 100 *мл*; 2) спиртовый раствор щелочи (1,0 н. КОН): 5,6 *г* КОН растворяют в 100 *мл* этанола; 3) раствор смеси триэтаноламин-гидрохлоридфосфата (0,5 *М* триэтаноламин; 0,4 *М* KH_2PO_4; 0,1 *М* K_2HPO_4: 9,30 *г* триэтаноламин-гидрохлорида, 5,44 *г* KH_2PO_4 и 1,74 *г* K_2HPO_4 растворяют в бидистиллированной воде и объем доводят до 100 *мл*; 4) триэтаноламингидрохлорид (1 *М* раствор): 18,6 *г* триэтаноламин-гидрохлорида растворяют в бидистиллированной воде и объем доводят до 100 *мл*; 5) насыщенный раствор сульфата аммония: около 80 *г* $(NH_4)_2SO_4$ при комнатной температуре суспендируют в бидистиллированной воде и объем суспензии доводят до 100 *мл*, изредка помешивают, оставляют стоять несколько часов; 6) пируват (1 *М* раствор): 1,10 *г* пирувата натрия растворяют в бидистиллированной воде и по растворении доливают до 100 *мл*; 7) лактатдегидрогеназа (см. стр. 121) — ЛДГ (0,5 *мг* протеина на 1 *мл*): основную взвесь соответственно разбавляют 2,1 *М* раствором сульфата аммония.

Все растворы сохраняют закупоренными в холодильнике, они устойчивы в течение нескольких месяцев.

Техника. *Подготовка исследуемого материала.* НАД-H_2 экстрагируют из исследуемого материала раствором щелочи, так как кислоты разрушают НАД-H_2. Для полной экстракции НАД-H_2, особенно из мышц, нагревают смесь из порошка ткани и раствора КОН (1 : 5 в/об) до 100°. Этим также гарантируется полная инактивация фермента. Нагревание должно продолжаться не более одной минуты, так как НАД-H_2 в горячей щелочи быстро распадается. Добавление спирта, содержащегося в растворе КОН, вызывает экстракцию НАД-H_2 и денатурирование белка. После экстракции спиртовой щелочью нейтрализованные экстракты менее мутны, чем после экстракции водной щелочью. Пробирки, содержащие каждая по 2 *мл* спиртовой щелочи (раствор 1), плотно закрывают полиэтиленовыми пробками, взвешивают и подогревают на водяной бане при 70°. При сильном помешивании (магнитная мешалка) как можно быстро вносят от 200 до 400 *мг* тканевого порошка, чтобы частицы ткани не приставали к стенкам сосуда выше поверхности жидкости (даже следы неденатурированной ткани после нейтрализации экстракта разлагают НАД-H_2). Пробирки сейчас же вновь крепко закупоривают, нагревают в течение 60 сек. при 70° на водяной бане, сразу охлаждают в ледяной воде, взвешивают (точное определение количества ткани). Через 10 мин. для нейтрализации при охлаждении на льду и помешивании осторожно добавляют 0,5 *мл* смеси триэтаноламин-HCl-фосфата (раствор 3) на 1 *мл* экстракта. pH должно быть равно 7,8; рекомендуется требуемое количество раство-

ра 3 определить заранее. Для лучшего образования хлопьев денатурированного белка оставляют стоять в течение 20 мин. при комнатной температуре. 10 мин. центрифугируют при 20 000—40 000 *g*. Почти чистую надосадочную жидкость используют для анализа. В крови белки осаждают без нагревания. Во избежание сильного разбавления используют концентрированный спиртовый раствор КОН. На каждый 1 *мл* крови в центрифужные пробирки отмеривают 0,5 *мл* 1 н. спиртового раствора КОН (2). При сильном помешивании вносят туда же кровь. Оставляют стоять в течение 5 минут при комнатной температуре, затем охлаждают на ледяной бане. Для осаждения гемохромогена из темно-коричневого раствора на 1 *мл* смеси приливают 0,5 *мл* насыщенного раствора сульфата аммония (5) и для последующей нейтрализации — 0,2 *мл* раствора триэтаноламина-HCl (4); pH должен быть около 7,8. Отцентрифуговывают осадок белка (10 мин. при 10 000 *g*). Очень (светлый) прозрачный экстракт используют для анализа неразбавленным.

При работе с митохондриями к 1 *мл* суспензии митохондрий добавляют 0,5 *мл* н. спиртового раствора КОН (2). Дают стоять 10 мин. при комнатной температуре, охлаждают на ледяной бане, прибавлением 1,5 *мл* смеси триэтаноламин-гидрохлорид-фосфата (раствор 3) доводят pH до 7,8. В дальнейшем работают, как указано для ткани.

Подготовка опыта. Измерение ведут при длине волны 340 или 334 *ммк*; толщина слоя 2 или 4 *см*; объем анализируемой жидкости 2,01 *мл* (при толщине слоя 4 *см* — 4,02 *мл*; при этом удвоить все объемы растворов); комнатная температура. Измерение против кюветы для сравнения с разбавленным (0,1%) раствором бихромата калия для компенсации окраски и небольшой мутности экстракта.

В кюветы последовательно отмеривают пипеткой: 2,00 *мл* экстракта, 0,005 *мл* раствора пирувата (6), перемешивают, отсчитывают экстинкцию E_1, вмешивают 0,005 *мл* суспензии ЛДГ[1] (7), через 3 мин. отсчитывают конечную экстинкцию E_2. Убыль экстинкции $\Delta E = E_1 - E_2$ используют для вычисления.

Вычисление. Формула для вычисления та же, что и для определения НАД (см. стр. 119).

Лактатдегидрогеназа из мышц реагирует не только с НАД-H_2, но и в незначительной мере также и с НАДФ-H_2. С увеличением pH скорость реакции с НАДФ-H_2 сильно снижается, так что лактатдегидрогеназа при pH 7,8 с НАД-H_2 реагирует в 2000 раз быстрее, чем с НАДФ-H_2. Используя небольшие количества ЛДГ, можно при этом pH количественно определить НАД-H_2, не считаясь с возможным влиянием одновременного окисления НАДФ-H_2.

Источники ошибок. Как известно, НАД-H_2 окисляется гемохромогеном, растворенным в щелочных экстрактах и образованным из гемоглобина. В условиях опыта (экстракт остается

---

[1] КФ. 1.1.1.27.

щелочным сравнительно недолго) с этим источником ошибки можно не считаться.

Для экстракции восстановленного НАД в литературе приводятся разные методы. Описана экстракция с водным раствором KOH при 100°, нагретым до 100° буфером (pH 8,6) с раствором Na_2CO_3 (pH10) [37, 38, 39]. Однако при анализе одной и той же пробы ткани эти методы дают расходящиеся и мало стабильные результаты. Точность метода 5%.

Определение никотинамидадениндинуклеотид-фосфата [40][1]

П р и н ц и п. НАДФ восстанавливают действием глюкозо-6-фосфата с глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой (Г6-Ф-ДГ, промежуточный фермент)[2]:

$$\text{Глюкозо-6-фосфат} + \text{НАДФ}^+ \underset{}{\overset{\text{Г6-Ф-ДГ}}{\rightleftarrows}} \text{6-фосфоглюконат} + \text{НАДФ-Н} + \text{H}^+ \quad (1)$$

$$\text{Константа равновесия } K_{\text{pH}} = \frac{K}{\text{H}^+} = \frac{(\text{6-фосфоглюконат})\cdot(\text{НАДФ-H}_2)}{(\text{глюкозо-6-фосфат})\cdot(\text{НАДФ})}$$

при 25° и pH 7 равна 10^5.

Р е а к т и в ы: 1) и 2) растворы хлорной кислоты, как и при определении никотинамидадениндинуклеотида); 3) двузамещенный фосфат калия (1 *M* раствор) как описано на стр. 118; 4) сульфат магния (1 *M* раствор): 2,4 *г* $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ растворяют в бидистиллированной воде и объем доводят до 10 *мл*; 5) раствор глюкозо-6-фосфата (около 0,1 *M* Г-6-Ф): 0,31 *г* Г-6-Ф-Na_2 растворяют в бидистиллированной воде и объем доводят до 10 *мл*; 6) глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа — Г-6-ФДГ (1 *мг* протеина на 1 *мл*): основную взвесь соответственно разбавляют 3,3 *M* раствором сульфата аммония.

Т е х н и к а. *Подготовка исследуемого материала.* НАДФ экстрагируют из исследуемого материала по методу, описанному для НАД; экстракт используют для анализа неразбавленным. Так как концентрация НАДФ в биологическом материале очень незначительна, желательно сделать все возможное для повышения чувствительности измерений (большие кюветы — толщина слоя, спектрофотометр высокой чувствительности.)

Постановка опыта. Измерение ведут при длине волны 340 *ммк* (но не 334 или 366 *ммк*); толщина слоя 4 *см*, объем анализируемой жидкости 4,080 *мл*, комнатная температура. Измерение ведут против воздуха или воды.

В кюветы последовательно отмеривают: 4,000 *мл* экстракта 0,020 *мл* раствора сульфата магния (4), 0,040 *мл* раствора Г-6-Ф (5), смешивают и отсчитывают экстинкцию E_1. Затем добавляют 0,020 *мл* суспензии Г-6-Ф-ДГ (раствор 6), через 15 мин. отсчитыва-

---

[1] Метод можно использовать и для анализа растительного материала.
[2] КФ 1.1.1.49.

ют конечную экстинкцию E_2. Убыль экстинкции $\Delta E = E_2 - E_1$ входит в вычисление.

Вычисление. Формула вычисления та же, что и для НАД.

Источники ошибок. Анализу мешают примеси глютатионредуктазы [1] в Г-6-Ф-препарате; мешает также НАДФ-H_2-оксидаза. Влияние незначительного обратного изменения экстинкции после окончания реакции можно ликвидировать посредством графической экстраполяции. Г-6-Ф-ДГ абсолютно специфична для НАДФ.

Для определения НАДФ может быть использована реакция, катализируемая изоцитрат-дегидрогеназой [2] [41]:

$$\text{Изоцитрат} + \text{НАДФ}^+ \rightleftarrows \alpha = \text{кетоглютарат} + \text{НАДФ-Н} + CO_2 + H^+ \qquad (2)$$

И здесь равновесие лежит на стороне образования НАДФ-H_2. Метод этот, однако, не нашел широкого применения. Точность метода около 5%.

Определение восстановленного никотинамидадениннуклеотидфосфата [42] [3]

Принцип. Для определения НАДФ-H_2 используют катализируемую глютаматдегидрогеназой (ГлДГ) [4] реакцию с α-кетоглютаратом:

$$\alpha\text{-кетоглютарат} + NH_4^+ + \text{НАДФ-}H_2 \underset{}{\overset{\text{ГлДГ}}{\rightleftarrows}} \text{глютамат} + \text{НАДФ}^+. \qquad (1)$$

$$\text{Константа равновесия } K = \frac{(\text{глютамат})\cdot(\text{НАДФ}^+)}{(\alpha\text{-кетоглютарат})\cdot(NH_4^+)\cdot(\text{НАДФ-}H_2)}$$

при 25° равна 10^6 1/моль.

Таким образом, равновесие смещено в сторону окисления НАДФ-H_2. Глютаматдегидрогеназа реагирует почти одинаково быстро с НАДФ-H_2 и НАД-H_2. Для определения НАДФ-H_2 нужно поэтому сперва окислить НАД-H_2 лактатдегидрогеназой [5] и пируватом.

Реактивы. Требуются все растворы, необходимые для определения НАД-H_2 (см. стр. 120). Кроме того: 8) α-кетоглютарат (0,5 *М* раствор): 0,73 *г* α-кетоглютаровой кислоты растворяют в 3 *мл* бидистиллированной воды, 3 н. раствором NaOH pH доводят до 7, дополняют бидистиллированной водой до 10 *мл*; 9) хлорид аммония (1 *М* раствор): 0,54 *г* NH_4Cl растворяют в бидистиллированной воде и дополняют до 10 *мл*; 10) глютаматдегидрогеназа — ГлДГ (20 *мг* протеина на 1 *мл*): основую взвесь соответственно разбавляют 2 *М* раствором сульфата аммония.

---

[1] КФ 1.6.4.2.

[2] КФ 1.1.1.41.

[3] Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

[4] КФ 1.4.1.2; 1.4.1.3; 1.4.1.4.

[5] КФ 1.1.1.27.

Т е х н и к а. *Подготовка материала.* НАДФ-H_2, так же как и НАД-H_2, экстрагируют из исследуемого материала. Как и НАД-H_2, НАДФ-H_2 полностью экстрагируется только спиртовым раствором КОН.

Постановка опыта. Измерение ведут при длине волны 340 или 334 *ммк* (но не 366 *ммк*); толщина слоя 2 или 4 *см*, объем анализируемой жидкости 2,025 или 4,050 *мл* (при толщине слоя 4 *см* — 4,050 *мл*; при этом все объемы растворов удвоить); комнатная температура. Измерение ведут против кюветы для сравнения с разбавленным раствором (0,1%) бихромата калия для компенсации окраски и помутнения экстракта.

В кюветы последовательно отмеривают: 2,000 или 4,000 *мл* экстракта, 0,005 или 0,010 *мл* раствора пирувата (6), 0,005 или 0,010 *мл* раствора α-кетоглютарата (8), 0,005 или 0,010 *мл* раствора хлорида аммония (9), размешивают, отсчитывают экстинкцию E_1. Добавляют 0,005 или 0,010 *мл* суспензии ЛДГ (раствор 7). Приблизительно через 3 мин. отсчитывают конечную экстинкцию E_2. Добавляют, размешивая, 0,005 или 0,010 *мл* суспензии ГлДГ (раствор 10), приблизительно через 10 мин. отсчитывают экстинкцию E_3.

Вычисление. Содержание НАДФ-H_2 вычисляют из $E_{НАДФН_2} = E_2 - E_3$ по формуле, как и для НАД.

И с т о ч н и к и о ш и б о к. Ввиду незначительного содержания НАДФ-H_2 в биологическом материале необходимо применять особо чувствительные измерительные приборы. В щелочной среде НАДФ-H_2 разлагается, особенно при нагревании, легче, чем НАД-H_2 (точно придерживаться времени нагревания!).

Метод (после окисления НАД-H_2) специфичен для НАДФ-H_2. Точность метода около 5%.

Для определения НАДФ-H_2 может быть использовано также ферментативное окисление НАДФ-H_2 глютатионом с глютатионредуктазой:

$$\text{окисленный глютатион} + \text{НАДФ-Н} + \\ + H^+ \underset{}{\overset{\text{глютатионредуктаза}^1}{\rightleftarrows}} 2\ \text{глютатиона} + \text{НАДФ}^+ \qquad (2)$$

И здесь равновесие благоприятствует образованию НАДФ [43, 44]. Фермент (глютатионредуктаза) [2] абсолютно специфичен для НАДФ-H_2. Поэтому НАДФ-H_2 можно определять наряду с НАД-H_2. Очищенный препарат фермента можно получить, например, из гороха. Однако специфическая активность таких препаратов незначительна по сравнению с глютаматдегидрогеназой [3] [45].

Броун и Кларк [47] предложили модификацию метода определения НАДФ-H_2 в биологических образцах с использованием ферментативного цикла. Образец, содержащий НАДФ-H_2, вносится в реакционную смесь, содержащую α-кетоглютарат, глютаматдегидро-

[1] КФ 1.6.4.2.
[2] КФ 1.6.4.2.
[3] КФ 1.4.1.2; 1.4.1.3; 1.4.1.4.

геназу [1], глюкозо-6-фосфат и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу [2]. В результате ферментативного цикла концентрации α-кетоглютарата и глюкозо-6-фосфата уменьшаются, а глютамата и 6-фосфоглюконолактона увеличиваются. В отличие от метода Лоури [46], в котором НАДФ-H_2 определяют по накоплению 6-фосфоглюконолактона, предложено определение НАДФ-H_2 по уменьшению количества глюкозо-6-фосфата. Это дает возможность использовать продажную глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу.

Модификация методики позволяет вести определение НАДФ-H_2 в крови человека [48]. Данных о проверке метода другими лабораториями не имеется.

Вилли [48] предложил ферментативный метод количественного определения НАД, НАД-H_2, НАДФ и НАДФ-H_2 в экстрактах животных тканей, являющийся модификацией метода Глока и Маклейна. Пробы ткани (по 200 *мг*) помещают в стеклянные гомогенизаторы, содержащие по 5 *мл* 0,1 н. раствора соляной кислоты или 0,1 н. раствора едкого натра, выдерживают 30 сек. в кипящей воде, гомогенизируют 90 сек. и нейтрализуют. Кислотный экстракт используют для определения НАД-H_2 и НАДФ-H_2, которые устойчивы в кислой среде, а щелочной экстракт применяют для определения НАД и НАДФ. Содержание НАД и НАД-H_2 определяют по скорости восстановления 2,6-дихлорфенолиндофенола в присутствии избытка диафоразы [3], спирта и специфической для НАД алкогольдегидрогеназы [4] — путем измерения поглощения при 600 *ммк*. Содержание НАДФ или НАДФ-H_2 определяют аналогичным образом, используя, вместо спирта и алкогольдегидрогеназы, глюкозо-6-фосфат и специфическую для НАД дегидрогеназу глюкозо-6-фосфата. Скорость восстановления 2,6-дихлорфенолиндофенола пропорциональна концентрации пиридиннуклеотида в пределах от 0,5 до 4,0 *мкмолей*. Диафораза в качестве промежуточного переносчика водорода от восстановленных пиридиннуклеотидов к 2,6-дихлорфенолиндофенолу может быть заменена феназинметасульфатом в концентрации 0,33 *мкмолей* [48]. Данных о проверке метода другими лабораториями не имеется.

Определение флавинмононуклеотида [49] [5]

П р и н ц и п. Лактат-оксидаза [6] из пневмококков катализирует реакцию:

$$\text{Лактат} + O_2 \rightarrow \text{ацетат} + CO_2 + H_2O. \quad (1)$$

Кофактором фермента является флавинмононуклеотид (ФМН). Содержание ФМН в пробе определяют по скорости реакции и изме-

---

1 КФ 1.4.1.2; 1.4.1.3; 1.4.1.4.
2 КФ 1.1.1.49.
3 КФ 1.6.4.3.
3 КФ 1.1.1.37.
5 Метод можно использовать и для анализа растительного материала.
6 КФ 1.1.3.2.

ряют по расходу кислорода в единицу времени в аппарате Варбурга. Калибровочную кривую строят по стандартному раствору. Метод похож на определение флавинадениндинуклеотида (ФАД) с апооксидазой *D*-аминокислот. Константа Михаэлиса лактат-апооксидазы для ФМН

$$K_м = 4{,}8 \cdot 10^{-7} M.$$

Реактивы: 1) фосфатный буферный раствор (1,0 *М*, pH 7,1): 138,0 *г* $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ и 178,05 *г* $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ растворяют в дистиллированной воде и объем доводят до 1000 *мл*; 2) *DL*-лактат (1,0 М раствор): 0,9601 *г* литий-*DL*-лактата растворяют в дистиллированной воде и объем доводят до 10 *мл*; 3) флавинмононуклеотид, ФМН: а) запасной раствор ($3{,}5 \cdot 10^{-4}$ *М*): 9 *мг* ФМН-NaH $\cdot 2H_2O$ растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 5 *мл*. Концентрацию определяют спектрофотометрически (коэффициент экстинкции ФМН при 450 *ммк* и pH 7 равен $\varepsilon = 11{,}3$ *см*²/*моль*; б) стандартный раствор ($7 \cdot 10^{-6}$ *М*): 0,1 *мл* раствора, а непосредственно перед употреблением разбавляют дистиллированной водой до 50 *мл*; 4) апофермент — приготовление раствора см. Приложение. Запасной раствор ФМН сохраняют в коричневых склянках. Растворы апоэнзима, лактата и ФМН сохраняются при — 15° несколько месяцев.

Техника. Подготовку исследуемого материала ведут так, как это указано при определении ФАД.

Постановка опыта. Анализ ведут в приборе Варбурга; газовая фаза — воздух; температура измерения 30°. Для каждого определения берут 2—3 исследуемые пробы, 3—4 стандартных раствора; 1 контрольный раствор (свободный от ФМН), 1 термобарометр.

Сосуды наполняют следующим образом:

Отделение сосуда	Жидкость	Исследуемый раствор, *мл*	Контрольный раствор, *мл*	Термобарометр, *мл*
Главное отделение	Буферный раствор (1) . .	0,1	0,1	—
Боковой резервуар	Апофермент (раствор 4)	0,1	0,1	—
Центральный стаканчик	Проба или стандартный раствор (3б)	1,7	—	—
	Дистиллированная вода	—	1,7	2,0
	Лактат (раствор 2) . . .	0,1	0,1	—
	5 н. раствор КОН (на куске фильтровальной бумаги)	0,1	0,1	—

Сосуды оставляют стоять 30 мин. в темноте при комнатной температуре (реактивация апофермента посредством ФМН).

Все сосуды около 10 мин. выдерживают при 30°. Содержимое бокового резервуара опрокидывают в главное отделение, краны закрывают, пускают секундомер, каждые 5 или 10 мин. отсчитывают показания манометра h, составляют Δh/*мин*, выводят среднее значение.

Вычисление. Расход кислорода ΔO_2/мин исследуемого и стандартного растворов вычисляют из манометрических показаний (*мм* столба жидкости), с учетом поправок по данным, полученным в термобарометре и в контрольном растворе, путем умножения на константу сосуда K.

Для стандартной смеси $\frac{1}{\Delta O_2/\text{мин}}$ наносят против $\frac{1}{\text{содержание ФМН}}$. По этой калибровочной кривой находят содержание ФМН в исследуемой смеси. Точность метода около 3%.

ФМН можно также определять спектрофотометрически [50].

П р и л о ж е н и е [49]. *Получение лактатоксидазы* (КФ 1.1.3.2). Автолизат из Diplococcus pneumoniae (R36 A) при 0—4° насыщают твердым сульфатом аммония до 50%. Центрифугируют, осадок отсасывают. Надосадочную жидкость путем прибавления твердого сульфата аммония доводят до 68% насыщения. Центрифугируют, осадок растворяют в растворе 0,02 *M* Na_2HPO_4 + 10^{-3} *M* ЕДТА. 3 часа диализируют при помешивании против этого раствора.

Получение апофермента. К 10 *мл* раствора, содержащего 2800 единиц лактатоксидазы [1] (специфичная активность: 35 *ед/мг*) добавляют 3,5 *мл* насыщенного раствора сульфата аммония. На холоду, при помешивании, очень медленно прибавляют 4,5 *мл* 0,1 н. раствора H_2SO_4, оставляют стоять 15 мин. при 0°, центрифугируют. Осадок промывают насыщенным раствором сульфата аммония, растворяют в 10 *мл* 0,1 *M* буферного раствора фосфата (pH 7,2).

Определение флавинадениндинуклеотида [51] [2]

П р и н ц и п. Метод основан на специфичном реактивировании апофермента оксидазы *D*-аминокислоты из свиных почек при помощи флавинадениндинуклеотида (ФАД). При малой концентрации ФАД (около 25 *мкг/мл*) расход кислорода пропорционален количеству ФАД. Этот расход измеряется манометрически. Необходимо сравнение со стандартным препаратом ФАД, так как константа Михаэлиса для ФАД изменяется с изменением температуры и от препарата к препарату. По-видимому, константа диссоциации варьирует между 0,13 и 0,33 *мкмоля*.

Р е а к т и в ы: 1) буферный раствор пирофосфата (0,1 *M*, pH 8,5); 5,32 *г* $Na_4P_2O_7$ или 8,92 *г* $Na_4P_2O_7$ растворяют в 150 *мл* дистиллированной воды, значение pH доводят до 8,5 приблизительно 4 *мл* 1 н. раствора H_2SO_4, доливают дистиллированную воду до 200 *мл*; 2) *DL*-аланин (1,0 *M* раствор); 0,891 *г* *DL*-аланина растворяют

[1] КФ 1.1.3.2.
[2] Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

в дистиллированной воде доводят объем до 10 *мл*; 3) буферный раствор фосфата (10^{-2} *М*, pH 7,0): а) 7,164 *г* $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ растворяют в дистиллированной воде и объем раствора доводят до 1000 *мл*; б) 2,760 *г* $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ растворяют в дистиллированной воде и по растворении объем доводят до 1000 *мл*, 61 *мл* раствора *а* смешивают с 39 *мл* раствора *б* и разбавляют дистиллированной водой по 200 *мл*, 4) флавинадениндинуклеотид, ФАД: а) запасной раствор (около $1{,}5 \cdot 10^{-3}$ *М*): 6 *мг* чистого ФАД (высушенного в вакууме при 50—60° над P_2O_5) растворяют в 5 *мл* фосфатного буферного раствора (3); б) рабочий раствор (около $3 \cdot 10^{-6}$ *М*); запасной раствор перед употреблением разбавляют дистиллированной водой до 500-кратного объема. После разбавления спектрофотометрически определяют точное содержание ФАД запасного раствора. Чистый ФАД при 450 *ммк* и pH, 7 имеет коэффициент экстинкции 11,3 *см²/ммоль*. Раствор, содержащий точно 6 *мг* ФАД/5 *мл*, содержит $1{,}5275 \cdot 10^{-3}$ *М* и после 50-кратного разбавления и pH 7, при 450 *ммк*, и толщине слоя 1 *см* дает экстинкцию равную 0,341. Для чистых препаратов ФАД коэффициент экстинкции при 260 и 450 *ммк* (pH 7) равен 3,25. Чистота препарата может быть проверена и бумажной хроматографией. Освободить ФАД от ФМН, рибофлавина и разных нуклеотидов удается при помощи электрофореза на бумаге ватман № 1 и элюции флюоресцирующего продукта, соответствующего метчику — ФАД. Чрезмерного действия ультрафиолетового света надо избегать. ФАД чувствителен к кислотам, основаниям и свету; 5) апофермент оксидазы *D*-аминокислот, полученный как указано в приложении, используют неразбавленным.

Фосфатный и пирофосфатный буферные растворы устойчивы в течение недель, если исключены условия для роста микроорганизмов. Растворы ФАД и апофермента устойчивы при — 15° несколько недель.

Техника. Растворы, содержащие свободный ФАД, можно прямо анализировать. Связанный с белком ФАД можно выделить в свободном виде в манометрическом сосуде в результате воздействия высокой температуры, приводящей к денатурированию белковой части. Манометрический сосуд с раствором, содержащим ФАД, держат 5 мин. в кипящей водяной бане; все остальные растворы добавляют после охлаждения. Особенно прочно связанный ФАД может быть выделен в свободном виде воздействием повышенной температуры, приводящей к денатурированию белка и протеолизу.

Так как исследуемый биологический материал сильно разбавляют (для достижения концентрации ФАД от 10^{-7} до 10^{-6} *М*), то в большинстве случаев можно пренебрегать присутствием мешающих веществ в пробе. Наличие в пробе более высоких концентраций (10^{-4} до 10^{-3} *М*) некоторых аналогов ФАД (ФМН, АМФ, АТФ, НАД, свободный рибофлавин и др.) оказывает заметное ингибирующее действие.

Мешающее влияние этих примесей можно устранить, применяя «внутренние» стандарты (содержащие стандартный раствор ФАД и

пробу). Потери, наблюдающиеся в процессе устранения примесей, можно возместить использованием таких внутренних стандартов.

Постановка опыта. Анализ ведут в приборе Варбурга; газовая фаза — воздух, температура измерения 37°. Исследуют 1—2 главные пробы, 3—4 стандартных раствора, 1 контрольный раствор (без ФАД) с применением термобарометра.

Сосуды наполняют следующим образом: поддерживая температуру 37°, содержимое бокового резервуара опрокидывают в главное отделение; краны закрывают, пускают секундомер и через каждые 5—10 мин. измеряют показания манометра, за 10 мин. используют от 10 до 40 *мкл* кислорода.

Отделение сосуда	Жидкость	Опытный и стандартный раствор, *мл*	Контрольный раствор, *мл*	Термобарометр
Главное отделение	Буферный раствор (1) . .	1,0	1,0	—
	Раствор апоэнзима (5) . .	0,3	0,3	—
	Проба или стандартный раствор (ФАД (4б)) . . .	0,6	—	
	Дистиллированная вода	—	0,6	2,1
Боковой резервуар	Раствор аланина (2) . . .	0,1	0,1	—
Центральный стаканчик	20%-ный раствор КОН (на куске фильтровальной бумаги)	0,1	0,1	—

Из показаний манометра (*мм* столбика жидкости) с учетом поправок по данным, полученным в термобарометре и контрольном растворе, вычисляют расход O_2 (ΔO_2/мин или ΔO_2/10 мин) для главного опыта и стандартного раствора. Найденные величины совпадают в пределах $\pm$ 5%; выводят средние значения.

Для стандартной смеси

$$\frac{1}{\Delta O_2/\text{мин}} \quad \text{или} \quad \frac{1}{\Delta O_2/10\ \text{мин}} \quad \text{наносят против} \quad \frac{1}{\text{содержание ФАД}}$$

(калибровочная кривая). По этой калибровочной кривой находят содержимое ФАД, относящееся к расходу кислорода в главном опыте. Молекулярный вес ФАД 785,6. Для малых концентраций ФАД между расходом кислорода и концентрацией ФАД существует линейная зависимость.

П р и л о ж е н и е. *Получение апофермента оксидазы D-аминокислот.* Сухой порошок фермента из свиных почек экстрагируют при комнатной температуре дистиллированной водой и центрифугируют. Надосадочная жидкость содержит около 10 *мг* белка на 1 *мл*. Все последующие этапы проводят при 0°. К 9,8 *мл* надосадочной жидко-

сти прибавляют 3,4 *мл* насыщенного раствора сульфата аммония. Медленно при помешивании добавляют 5,6 *мл* 0,1 н. раствора H_2SO_4, центрифугируют. Надосадочную жидкость отбрасывают. Осадок промывают 4,9 *мл* насыщенного раствора сульфата аммония, заново центрифугируют. Надосадочную жидкость отбрасывают. Осадок суспендируют в 3,5 *мл* 0,1 *M* Na-фосфатного буферного раствора (pH 7,2), центрифугируют, осадок отбрасывают. Надосадочную жидкость используют неразбавленной или сохраняют при — 15°. Детали см. [51]. Точность метода 3%.

Определение кокарбоксилазы [52]

Принцип. При действии на кокарбоксилазу минеральных кислот одна молекула фосфорной кислоты легко отщепляется, а вторая, непосредственно соединенная с тиазольным кольцом, отщепляется только при ферментативном гидролизе. Тиохромный метод определения кокарбоксилазы основан на ферментативном превращении ее в нефосфорилированный витамин B_1, который определяется вместе с присутствующим в исследуемом объекте свободным витамином. Разность между суммой свободного и связанного тиамина и свободным тиамином соответствует количеству связанного тиамина, по которому рассчитывают кокарбоксилазу. Методами, описанными для свободного витамина B_1, кокарбоксилаза не определяется, так как ее окисленная форма изобутанолом не извлекается [52].

Определение кокарбоксилазы в крови

Для определения кокарбоксилазы пробу крови делят на две части: в одной из них определяют свободный тиамин, в другой — сумму свободного тиамина и тиамина, полученного при ферментативном расщеплении кокарбоксилазы.

Энзиматическое расщепление кокарбоксилазы крови производится при помощи экстракта препарата фермента.

Метод определения свободного тиамина описан в другой работе [1]. Приводим метод определения суммы свободного и связанного тиамина.

Реактивы: 1) экстракт препарата фермента готовится следующим образом [52]: навеска сухого препарата Aspergillus niger экстрагируется ацетатным буфером (pH 4,5—5,0) на холоду в течение 2—3 час. при периодическом взбалтывании, после чего экстракт фильтруется; навеска препарата берется из расчета 50 *мг* сухого вещества на 5 *мл* ацетатного буфера, так как на 5 *мл* крови требуется 5 *мл* экстракта; 2) ацетатный буфер (pH 4,5—5,0): 22,3 *мл* 80%-ной уксусной кислоты и 44,62 *г* безводного CH_3COONa растворяют в 1 *л* дистиллированной воды.

[1] В. С. Асатиани. Биохимическая фотометрия. М., Изд-во АН СССР, 1957, стр. 263.

Остальные реактивы и аппаратура те же, что для определения свободного тиамина в крови.

Техника. 5 *мл* «оксалатной» крови помещают в колбочку, прибавляют 20 *мл* 0,25 н. раствора HCl и нагревают 15 мин. на кипящей водяной бане для разрушения комплекса кокарбоксилазы с белком. К теплому раствору при взбалтывании по каплям прибавляют 20%-ный раствор Na_2CO_3 до тех пор, пока не будет достигнут pH 5,0—5,2. После охлаждения прибавляют 5 *мл* отфильтрованного экстракта Aspergillus niger, 2—3 капли толуола или хлороформа и, закрыв колбочку ватной пробкой, помещают ее на 12—15 час. в термостат при 37°. После этого содержимое колбы нагревают в течение 3 мин. на кипящей водяной бане, охлаждают, доводят общий объем до 20 *мл* и центрифугируют (или фильтруют через фильтр, предварительно отмытый горячей дистиллированной водой от флуоресцирующих веществ).

К 10—12 *мл* фильтрата прибавляют 2 *мл* 20%-ной трихлоруксусной кислоты и дальше поступают так, как указано при определении свободного тиамина в крови.

По разности между общим содержанием тиамина после расщепления кокарбоксилазы (сумма свободного и связанного тиамина) и содержанием свободного тиамина, определенного в отдельной пробе крови без энзиматического гидролиза, рассчитывают количество кокарбоксилазы.

Известно, что 1 *мкг* тиамина соответствует 1,41 *мкг* кокарбоксилазы, поэтому для пересчета тиамина в кокарбоксилазу следует количество микрограммов тиамина, соответствующее последней, умножить на 1,41. Точность метода 4%.

Определение кокарбоксилазы в моче [1]

Исследуемая моча делится на две части: в одной определяется свободный тиамин, в другой — сумма свободного и связанного тиамина, полученная после применения экстракта Aspergillus niger для энзиматического расщепления кокарбоксилазы. Разница между содержанием общего и свободного тиамина соответствует кокарбоксилазе.

Определение кокарбоксилазы в тканях

Исследуемый образец ткани делят на две части: в одной определяют свободный витамин B_1, в другой — сумму свободного и связанного тиамина.

Реактивы и аппаратура те же, что и для определения кокарбоксилазы в крови.

Техника. *Определение суммы свободного и связанного тиамина* 0,3—1 *г* исследуемой ткани измельчают и растирают в ступке с пес-

---

[1] См. сноску на стр. 130.

ком и обрабатывают 15 *мл* 0,25 н. раствора HCl. Содержимое ступки переносят в колбочку и нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин. После нагревания раствор охлаждают и доводят до pH 5,0—5,2 при помощи 40%-ного раствора Na_2CO_3, затем прибавляют 5 *мл* профильтрованного экстракта препарата Aspergillus niger, 2—3 капли толуола или хлороформа и, закрыв колбу ватной пробкой, помещают в термостат на 12—15 час. при 37°. После инкубации содержимое колбы нагревают в течение 3 мин. на кипящей водяной бане и охлаждают. Общий объем доводят до 20 *мл* дистиллированной водой, фильтруют и далее поступают так, как указано при определении свободного витамина B_1 в тканях.

Количество кокарбоксилазы рассчитывают по разности между суммой свободного и связанного тиамина и свободным тиамином, умножая ее на 1,41. Точность метода 5%.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Lynen F.* u. *Wieland O.* В кн. Colowick S. a. Kaplan N. Methods in Enzymology. New York, Academic Press, 1955, Bd 1, p.566
2. *Stadtman E.* et al. J. Biol. Chem., 1951, **191**, 365.
3. *Michal G.* et al. В кн. Bergmeyer H. Methoden d. Enzymatischen Analyse, Weinheim, 1962, 512.
4. *Srere P.* J. Biol. Chem., 1959, **234**, 2544.
5. *Decker K.* В кн. Bergmeyer H. (см. [31]), стр. 425.
6. *Stern G.* J. Biol. Chem., 1956, **221**, 33.
7. *Lynen F.* et al. Biochemical problems of lipids. Butterworth. London, 1956, p. 224.
8. *Stern G.* et al. J. Biol. Chem., 1956, **221**, 1.

8a. *Stadtman E.* et al. J. Biol. Chem., 1951, **191**, 365.

9. *Michal G.* u. *Bergmeyer H.* В кн. Bergmeyer H. (см. [31], стр. 431).
10. *Tabor H.* et al. J. Biol. Chem., 1953, **204**, 127.
11. *Ochoa S.* In: Colowick S. a. Kaplan N. Methods in Enzymology. New York, Academic Press, 1957, Bd 1, 687.
12. *Stadtman E.* В кн. Colowick S. a. Kaplan N. Methods in Enzymology. New York, 1957, Bd III, p. 935.
13. *Lipmann F.* a. *Tuttle L.* J. Biol. Chem., 1945, **159**, 21.
14. *Lynen F.* Liebigs Ann. Chem., 1951, **574**, 33.
15. *Vagelos P.* et al. J. Biol. Chem., 1959, **234**, 490.
16. *Vagelos P.* a. *Earl J.* J. Biol. Chem., 1959, **234**, 2272.
17. *Vagelos P.* a. *Earl J.* J. Biol. Chem., 1959, **234**, 2272.
18. *Decker K.* В кн. Bergmeyer H., см. [31], стр. 441.
19. *Stern J.* et al. J. Amer. Chem. Soc., 1955, **77**, 1073.
20. *Seubert W.* a *Lynen F.* J. Amer. Chem. Soc., 1953, **75**, 2787.
21. *Stern G.* a. *Del Campillo A.* J. Amer. Chem. Soc., 1955, **75**, 2277.
22. *Stern G.* a. *Del Campillo A.* J. Biol. Chem., 1956, **218**, 985.
23. *Langdon R.* J. Amer. Chem. Soc., 1955, **77**, 5190.
24. *Seubert W.* et al. Angew. Chem., 1957, **69**, 359.
25. *Stern G.* et al. J. Biol. Chem., 1956, **218**, 971.
26. *Seubert W.* В кн. Bergmeyer H., см. [31], стр. 433.
27. *Crane F.* et al. J. Biol. Chem., 1956, **218**, 701.
28. *Crane F.* a. *Beinert R.* J. Biol. Chem., 1956, **218**, 717.
29. *Stern J.* et al. J. Biol. Chem., 1952, **198**, 313.
30. *Knappe J.* Dissertation. Universität München, 1957.
31. *Bergmeyer H.* Methoden der enzymatischen Analyse. Weinheim, 1962, S. 445
32. *Tabor H.* et al. J. Biol. Chem., 1953, **204**, 127.

33. *Wieland O.* et al. Biochem. Z., 1960, **333**, 10.
34. *Ochoa S.* In: Colowick S. a. Kaplan N. Methods in Enzymology New York, Academic Press, 1955, Bd. 1, p. 685.
35. *Lynen F.* et al. Bioch. Z., 1958, **330**, 269.
36. *Klingenberg M.* В кн. Bergmeyer H., см. [31], стр. 528.
37. *Spirte M.* a. *Eichel H.* Arch. Bioch. Bioph., 1954, **53**, 308.
38. *Jegeikin L.* a. *Weinhouse S.* J. Biol. Chem., 1958, **213**, 271.
39. *Jakobson K.* a. *Astradan L.* Arch. Bioch. Bioph., 1957, **71**, 69.
40. *Klingenberg M.* В кн. Bergmeyer, см. [31], стр. 535.
41. *Klingenberg M.* u. *Slenska W.* Bioch. Z., 1959, **331**, 486.
42. *Klingenberg M.* В кн. Bergmeyer H., см. [31], стр. 577.
43. *Ciotti M.* a. *Kaplan N.* В кн. Colowick S. a. Kaplan N. Methods in Enzymology. New York, 1957, Bd III, p. 890.
44. *Klingenberg M.* u. *Slenczka W.* Bioch. Z., 1959, **331**, 486.
45. *Racker E.* В кн. Colowick S. a. Kaplan N. Methods in Enzymology, N. Y., 1956, Bd II, p. 722.
46. *Lowry A.* et al. J. Biol. Chem., 1961, **236**, 2746.
47. *Brown E.* a. *Clarke D.* J. Lab. Clin. Med., 1963, **61**, 889.
48. *Villee C.* Bioch. J., 1962, **83**, 191.
49. *Udaka S.* et al. J. Bacter., 1959, **78**, 714.
50. *Haas E.* et al. J. Biol. Chem., 1960, **136**, 747.
51. *Straub F.* Bioch. J., 1939, **33**, 787.
52. *Елисеева Г. Д.* Укр. биохим. ж., 1951, **23**, 236; сб. «Витамины». Киев, Изд-во АН СССР, 1953, стр. 38.
53. *Асатиани В. С.* Биохимическая фотометрия. М., Изд-во АН СССР, 1957, стр. 49.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УГЛЕВОДОВ

Определение галактозы [1]

Принцип. Галактооксидаза[1], выделенная из культуры Polyporus ciracinatus, Fr., окисляет галактозу, переводя ее в соответствующий лактон; одновременно образующаяся перекись водорода в присутствии пероксидазы[2] окисляет *о*-дианизидин, переводя его в окрашенную форму. Количество образующегося окрашенного продукта определяют спектрофотометрически.

Реактивы: 1) реактив на галактозу: состоит из 50 *мл* 0,1 *М* раствора двузамещенного фосфата натрия, реакция которого доводится до pH 7 добавлением некоторого количества 1 н. раствора едкого натра, 500 *мг* пероксидазы, 25 *мг* галактооксидазы (ацетоновый препарат) и 0,05 *мл* 5%-ного раствора *о*-дианизидина в ацетоне; 2) стандартные растворы галактозы: 50, 100 и 150 *мг* галактозы растворяют в 0,1%-ном растворе бензойной кислоты, объем каждого раствора доводят до 100 *мл*.

Раствор галактооксидазы темнеет даже при оставлении на ночь, поэтому его следует употреблять в течение немногих часов после приготовления.

Техника. К 0,1 *мл* исследуемого материала (крови или сыворотки) добавляют 0,5 *мл* воды, затем при помешивании добавляют 0,2 *мл* реактива галактооксидазы, оставляют стоять при комнатной температуре в течение 1 часа и определяют оптическую плотность окрашенного раствора при 450 *ммк*. Одновременно то же определение проводят со слепой пробой и с тремя стандартными растворами, содержащими 50, 100 и 150 *мг* галактозы в 100 *мл*.

Вычисление. Строят калибровочную кривую по значениям оптической плотности трех стандартных растворов против концентраций (за вычетом показаний слепого определения). Калибровочная кривая, полученная таким путем, пригодна для тех случаев, когда концентрация галактозы в исследуемом материале не ниже 20 *мг* на 100 *мл*. Количество галактозы, найденное по калибровочной кривой, помножают на разведение.

Источники ошибок. Наряду с галактозой фермент реагирует с ксилозой, аскорбиновой кислотой, а также с лактозой, возможно вследствие гидролиза последней. При концентрации га-

[1] КФ 1.1.3.9.
[2] КФ 1.11.1.7.

лактозы выше 20 *мг* в 100 *мл* оптическая плотность образующегося окрашенного раствора изменяется линейно с изменением концентрации. Если концентрация галактозы в исследуемом материале ниже указанной величины, то необходимо одновременно вести определение в нескольких водных стандартных растворах. Данных о проверке метода другими лабораториями не имеется.

Фрингс и Гери описали автоматический ферментативный метод определения галактозы в крови, основанный на катализе окисления галактозы галактозооксидазой. Образующаяся при ферментативной реакции H_2O_2 окисляет *о*-дианизидин в присутствии пероксидазы до продукта, поглощающего свет при 440 *ммк*. Образование окрашенного продукта контролируют спектрофотометрически, пользуясь автоматическим отсчетом времени, требуемого для снижения процента пропускания, установленного предварительно. Градуировочный график представляет собой прямую в координатах: величина, обратная измеренному интервалу времени, против концентрации галактозы. Для водных растворов галактозы в области концентрации галактозы 33—500 *мкг/мл*, получены относительные стандартные отклонения в пределах 2%. Аналогичные по точности результаты получены и для галактозы в крови в области 99—1500 *мг* галактозы на 100 *мл* [2].

Модификацию метода определения галактозы с применением препарата галактозооксидазы предложил также Уолдстейн [2а]. Данных о проверке метода другими лабораториями не имеется.

Определение *L*-ксилулозы [3][1]

Принцип. НАДФ-ксилит-(*L*-ксилулоза)-дегидрогеназа катализирует реакцию:

$$L\text{-ксилулоза} + \text{НАДФ-Н} + H^+ \rightleftarrows \text{ксилит} + \text{НАДФ}^+.$$

В присутствии незначительного избытка НАДФ-H_2 и фермента реакция быстро приходит к концу и образуется количественно ксилит. Уменьшение экстинкции при 340 *ммк* прямо пропорционально содержанию *L*-ксилулозы в исследуемом растворе.

Реактивы. Все растворы приготовляют на бидистиллированной воде: 1) трис-буферный раствор (0,10 *М* pH 7,0); 1,21 *г* трис-гидрометиламинометана растворяют в 80 *мл* воды, прибавляют 1 н. раствор HCl до pH 7,0 и доливают водой до 100 *мл*; 2) раствор восстановленного никотинамидадениндинуклеотидфосфата (около 0,01 *М* НАДФ-Н2): 10 *мг* НАДФ-HNa_4 растворяют в 1 *мл* дистиллированной воды; 3) цистеингидрохлорид (0,05 *М*): 79 *мг* цистеингидрохлорида растворяют в 5 *мл* воды, доводят pH 1 н. раствором KOH до 7,0, и доводят водой до 10 *мл*; 4) магний хлорид (0,05 *М* раствор): 1,02 *г* $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*;

[1] Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

5) раствор едкого кали (1,0 н): 5,6 *г* KOH растворяют в воде и доводят объем до 100 *мл*; 6) НАДФ-ксилит- (*L*-ксилулоза)-дегидрогеназа (около 60 ед. на 1 *мл*); водный раствор фермента в зависимости от необходимости соответственно разводят дистиллированной водой.

Трис-буферный раствор и раствор $MgCl_2$ при 0° неограниченно стойки. Раствор цистеина сохраняют при 0° и нейтрализуют раствором KOH непосредственно перед употреблением. Он должен изготовляться ежедневно свежим. Значение pH раствора НАДФ-H_2, когда нужно, следует установить на 7,0—8,0; раствор сохраняют при —10°, при этих условиях он стабилен несколько недель.

Техника. *Подготовка материала.* 20 частей 10—20%-ного гомогената соединяют с 1 частью 60%-ной (в/в) $HClO_4$. Охлаждают до 0°, центрифугируют, холодную надосадочную жидкость осторожно нейтрализуют 1 н. раствором KOH (5), оставляют на 30 мин. при 0°, центрифугируют. Вместо $HClO_4$ можно применять для осаждения белков также трихлоруксусную кислоту. Избыточную кислоту удаляют трех- или четырехкратной экстракцией надосадочной жидкости одинаковым объемом этилового эфира. Затем тотчас нейтрализуют.

Постановка опыта. Измерение ведут при длине волны 340 *ммк* и комнатной температуре в кварцевых кюветах емкостью 1,5 *мл*, толщина слоя 1,0 *см*. В каждой серии опытов должна быть контрольная кювета с водой вместо раствора пробы. Измерение проводят против сравнительной кюветы, которая наполнена только водой.

Отмеривают пипеткой в контрольную кювету и кювету опыта: 0,4 *мл* трис-буферного раствора (1), 0,01 *мл* раствора НАДФ-H_2 (2); 0,1 *мл* раствора $MgCl_2$ (4); 0,01—0,02 *мл* раствора фермента (6) (содержащие 1 единицу фермента), пробу, содержащую 0,01—0,06 *мкмолей* *L*-ксилулозы; соответственное количество H_2O (в контрольную кювету); дистиллированную воду до 1 *мл*. За уменьшением экстинкции следят 15—20 мин. с 3-минутными промежутками в обеих кюветах при 340 *ммк*. Измеряют конечное значение.

Вычисление. Содержание *L*-ксилулозы в опыте вычисляют по следующей формуле:

$$\frac{E_k - E_v}{6,22} = \text{мкмолей } L\text{-ксилулозы в 1 мл опыта},$$

где E_k — конечная экстинкция контрольной кюветы; E_v — конечная экстинкция кюветы опыта; 6,22 — коэффициент экстинкции НАДФ-H_2 (см²/*мкмолей*).

Пример. Из материала, содержащего приблизительно 4 *мкмоля* *L*-ксилулозы на 1 *мл*, было взято для анализа 0,01 *мл*. По окончании реакции экстинкции при 340 *ммк* составили: контрольная

кювета — 0,622; кювета опыта —0,393. Отсюда:

$$\frac{0,622-0,393}{6,22}=\frac{0,229}{6,22}=0,037 \text{ } \textit{мкмолей} \text{ } L\text{-ксилулозы в 1 } \textit{мл} \text{ опыта}$$

или

$$\frac{0,037}{0,01}=3,7 \text{ } \textit{мкмоля} \text{ } L\text{-ксилулозы в 1 } \textit{мл} \text{ исследуемого материала.}$$

Источники ошибок. Очищенная НАДФ-ксилит (L-ксилулоза)-дегидрогеназа специфична для L-ксилулозы и НАДФ-H_2 НАД-H_2 и D-ксилулоза не реагируют. Кроме того, неэффективны: D-фруктоза, D-рибулоза, D-рибоза, D-ксилоза, L-сорбоза, D-альтрогептулоза, D-эритрулоза и D-галактуроновая кислота. В более высокой концентрации (в 20 и 30 раз) L-рибулоза реагирует намного медленнее, чем L-ксилулоза.

Ксилулоза может быть определена колориметрически при помощи реакции с цистеинкарбазолом[1]. Однако этот тест не делает различия между стереоизомерами кетопентозы и непригоден в присутствии фруктозы, сорбозы, рибулозы и седогептулозы. НАД-H_2 и НАДФ-H_2 в одинаковой концентрации также нарушают реакцию.

Определение *D*-ксилулозы[2] [4]

Принцип. НАД-ксилит-(D-ксилулоза)-дегидрогеназа катализирует реакцию:

$$D\text{-ксилулоза} + \text{НАД-Н} + H^{+} \rightleftarrows \text{ксилит} + \text{НАД}^{+}.$$

Равновесие лежит далеко в правой стороне. В присутствии незначительного избытка восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (НАД-H_2) и фермента реакция протекает при количественном образовании ксилита и быстро заканчивается. Уменьшение экстинкции при 340 *ммк* пропорционально содержанию D-ксилулозы в опыте.

Реактивы: см. определение L-ксилулозы (стр. 135), но реактив (2) здесь восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (около 0,01 *М* раствор НАД-H_2); 10 *мг* НАД-Н Na_2 растворяют в 1 *мл* дистиллированной воды; 6) НАД-ксилит (D-ксилулоза)-дегидрогеназа (50—100 *ед/мл*): водный раствор фермента разбавляют соответственно водой в случае необходимости.

Техника. Осаждение белков: см. выше, стр. 135, определение L-ксилулозы.

Постановка опыта: см. постановку опыта с L-ксилулозой (вместо «раствор НАДФ-H_2» следует читать: «раствор НАД-H_2», вместо «L-ксилулоза» — «D-ксилулоза».

Вычисление: см. определение L-ксилулозы (стр. 135). Вместо «L-ксилулоза НАДФ-H_2» следует читать: «D-ксилулоза и НАД-H_2».

[1] G. Ashwell a. J. Hickman. J. Biol. Chem., 1957, 226, 65.

[2] Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

Источники ошибок. НАД-ксилит-(D-ксилулоза)-дегидрогеназа пока еще не настолько очищена, как аналогичный фермент НАДФ. Ее специфичность не так выражена. Хотя препарат инертен по отношению к L-ксилулозе и НАДФ-H_2, он реагирует с L-эритрулозой и НАД-H_2. Так как L-эритрулоза может быть определена колориметрическим способом [3], то недостаточная специфичность фермента не должна была бы служить помехой в нормальных условиях. Тот факт, что и L-эритрулоза реагирует в условиях опыта, мог бы скорее оказаться полезным при исследовании обмена тетрозы.

Другие методы определения — см. определение L-ксилулозы.

Определение L-эритрулозы[1] [5]

Принцип. Полиолдегидрогеназа (ПДГ) гидролизует L-эритрулозу с НАД-H_2 согласно уравнению:

$$L\text{-эритрулоза} + \text{НАД-Н} + H^+ \rightleftarrows L\text{-треит} + \text{НАД}^+.$$

В качестве продукта гидрирования L-эритрулозы был идентифицирован L-треит. Равновесие реакции лежит на правой стороне. Константа Михаэлиса с L-эритрулозой составляет $K_M = 2{,}5 \cdot 10^{-2}$ *M*. Поэтому сродство фермента и L-эритрулозы так незначительно, что для количественного определения небольших количеств L-эритрулозы следует применять по возможности чистый препарат фермента высокой концентрации.

Реактивы: 1) триэтаноламиновый буферный раствор (0,20 *M* pH 7,2): 7,46 *г* триэтаноламина растворяют примерно в 100 *мл* бидистиллированной воды; pH устанавливают равным 7,4 (стеклянный электрод), добавляя около 17 *мл* 2 н. раствора HCl; после уравнивания температуры доливают водой до 250 *мл* и контролируют значение pH на стеклянном электроде; 2) восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (около $1 \cdot 10^{-2}$ *M* раствор НАД-H_2): 10 *мг* НАД-Н-Na_2 растворяют в бидистиллированной воде до 1,0 *мл*; 3) полиолдегидрогеназа — ПДГ (около 10 *мг* белка на 1 *мл*): препарат соответственно разводят 0,01 *M* раствором трис-гидроксиметиламинометана — буферный раствор, pH 7,4 (получение препарата см[2].).

Техника. Получение и подготовка исследуемого материала (кровь, ткань и пр.) см. определение пирувата.

Постановка опыта. Измерение ведут при длине волны 340 или 366 *ммк*, толщина слоя 0,5 *см*, объем анализируемой жидкости 0,4 *мл*. Температура комнатная. Буферный раствор и раствор пробы доводят до комнатной температуры; последовательно отмеривают пипеткой в кюветы: в кювету опыта — 0,21 *мл* буферного раствора (1), 0,10 *мл* раствора пробы, 0,03 *мл* раствора НАД-H_2 (2); в срав-

[1] Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

[2] H. Holzer a. H. Goedde. Bioch. Bioph. Acta, 1960, 40, 297.

нительную кювету — 0,21 *мл* буферного раствора (1), 0,10 *мл* H_2O, 0,03 *мл* раствора НАД-H_2 (2).

Отмечают экстинкции растворов в обеих кюветах. Если в них не появляется большего изменения экстинкции, чем от 0,001 до 0,002 за 30 сек., то в обе кюветы добавляют, помешивая, 0,06 *мл* раствора ПДГ (3). Реакция заканчивается приблизительно через 60 мин. Тогда в кювете опыта получают то же временное изменение экстинкции, что и в контрольной. Кювета со всеми компонентами опыта, которая, однако, содержит воду вместо раствора фермента в общем не показывает никакого заметного изменения экстинкции. Входящая в вычисление величина E получается из разницы в экстинкции между пробой и контролем после прекращения реакции минус разница в экстинкции между пробой и контролем перед началом реакции с ПДГ. Изменение экстинкции, которое вызывается собственной абсорбцией фермента и разведением опыта, можно определить после добавления фермента в контрольную кювету. Появляющееся изменение экстинкции (в зависимости от величины начальной экстинкции, обусловленной НАД-H_2 и абсорбцией света ферментным раствором) может быть положительным или отрицательным; обычно его не учитывают.

Вычисление. $\Delta E \cdot V/\varepsilon \cdot d$-*мкмолей* эритрулозы в содержимом кюветы. ΔE является уменьшением экстинкции (измеренной после добавления ПДГ), исправленным, согласно приведенной прописи. ε-коэффициент экстинкции (десятичный логарифм, *см*^{2}/*мкмоль*), который составляет для НАД-H_2 3,3 при 366 *ммк*, 6,2 — при 340 *ммк* и 5,9 — при 334 *ммк*; d — толщина слоя кюветы, *см*; V — общий объем анализируемой пробы, *мл*. Точность метода 3%.

В том же растворе пробы и в том же опыте можно определять другие субстраты, добавляя специфические ферменты до определения эритрулозы, например оксипируват с кристаллической лактатдегидрогеназой[1] и гликолевый альдегид с кристаллической алкогольдегидрогеназой[2] из дрожжей.

Определение *D*-ксилулозы и *D*-ксилозы[3] [6]

П р и н ц и п. *D*-ксилозоизомераза катализирует процесс *D*-ксилулоза $\rightleftarrows$ *D*-ксилоза.

Равновесие лежит на стороне образования альдопентозы, константа равновесия составляет 4,55 при 23°. В присутствии избытка изомеразы *D*-ксилулоза превращается, таким образом, на 82% в *D*-ксилозу. *D*-ксилулоза не дает реакции с цистеинкарбазолом. Если этот тест окрашивания проводят до и после инкубации с *D*-ксилозоизомеразой, то разница интенсивности окрашивания соответствует 82% *D*-ксилулозы, содержащейся в пробе. Для контроля (калибрования) применяют кристаллический рибулозо-*о*-нитро-

[1] КФ 1.1.1.27.
[2] КФ 1.1.1.37.
[3] Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

фенилгидразин, который в тесте окрашивания реагирует количественно как кетопентоза. Для определения D-ксилозы ферментную реакцию проводят в боратном буферном растворе (pH 8,2), вместо трис-буферного раствора (pH 7,5). При pH 8,2 равновесие указанной выше реакции лежит в направлении образования кетопентозы. В качестве стандарта применяют кристаллическую D-ксилозу.

Реактивы: 1) трис-буферный раствор (0,05 *M*, pH 7,5): 2,42 *г* трис-гидроксиметиламинометана растворяют в 100 *мл* дистиллированной воды, значение pH доводят посредством 0,2 н. раствора HCl до 7,5, приливают дистиллированной воды до 400 *мл*; 2) цистеингидрохлорид (1,5%-ный раствор в/о): 1,5 *г* цистеингидрохлорида растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*; 3) карбазол (0,12%-ный раствор в/о): 0,12 *г* карбазола растворяют в 20 *мл* этанола и доливают до 100 *мл*; 4) серная кислота; 70 *мл* концентрированной H_2SO_4 добавляют к 30 *мл* дистиллированной воды; 5) боратный буферный раствор (0,1 *M*, pH 8,2): 1,24 *г* борной кислоты растворяют в 100 *мл* дистиллированной воды, добавляют 14,6 *мл* раствора бората (19,177 *г* $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ в 100 *мл* воды), смесь разводят дистиллированной водой до 200 *мл*; 6) D-ксилоза, стандартный раствор ($2 \cdot 10^{-3}$ *M*): 30 *мг* D-ксилозы растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*; 7) L-рибулозо-*о*-нитрофенилгидразин, стандартный раствор ($2 \cdot 10^{-3}$ *M*): 28,5 *мг* L-рибулозо-*о*-нитрофенилгидразина растворяют в абсолютном алкоголе и дополняют до 50 *мл*; 8) D-ксилозоизомераза (1,8 *мг* белка на 1 *мл*); ферментный раствор соответственно разводят 0,05 *M* трис-буферным раствором.

Раствор фермента сохраняют при —16°, все остальные реактивы держат в холодильнике. Если трис-буферный раствор мутнеет, его фильтруют. Раствор цистеина следует заново готовить каждые две недели.

Техника. *Подготовка исследуемого материала.* Для осаждения белков исследуемый материал соединяют с $^1/_{30}$ объема хлорной кислоты (60%-ный раствор в/в) и центрифугируют; избыток удаляют при помощи ионообменника (амберлит МВ-3 или МВ-4) [1]. Сильно разведенные растворы концентрируют в вакууме при 40°. Растворы кетопентозы не должны становиться щелочными.

Постановка опыта. В пробирку отмеривают пипеткой: 0,95 *мл* дистиллированной воды и соответственно 0,05 *мл* раствора (7) (0,1 *мкмоля* L-рибулозо-*о*-нитрофенилгидразина), 6 *мл* H_2SO_4 (4), 0,2 *мл* раствора цистеина (2), 0,2 *мл* раствора карбазола (3). После каждого добавления раствора (3) основательно перемешивают. Смеси дают постоять 1 час при комнатной температуре, измеряют экстинкцию в кювете (толщина слоя 1 *см*) при 540 *ммк* (E-стандарт).

Определение D-ксилулозы. Отмеривают пипеткой в маленькую пробирку, конически сужающуюся книзу: 0,03 *мл* трис-буферного раствора (1), 0,04 *мл* пробы (содержащей около 2 *мкмолей* D-кси-

---

[1] D. Burma a. D. Horecker. J. Biol. Chem., 1958, 231, 1053.

лулозы), смешивают, берут 0,05 *мл*, остальную смесь соединяют с 0,01 *мл* раствора *D*-ксилозоизомеразы[1] (8), инкубируют при 23° и каждые 20 мин. берут по 0,05 *мл*. Каждую из проб по 0,05 *мл* (P_0, P_1, P_2) соединяют с 0,95 *мл* дистиллированной воды и 6 *мл* H_2SO_4 (4), основательно смешивают, добавляют 0,2 *мл* раствора карбазола (3). Полученные смеси оставляют на 1 час при комнатной температуре и разливают по кюветам. Измеряют экстинкции всех обработанных таким образом проб (P_0, P_1, P_2) при 540 *ммк* (E_0, E_1, E_2... $E_{конеч}$). Все пробы, взятые через 60 мин., должны иметь одинаковую экстинкцию ($E_{конеч}$).

Вычисление. Содержание *D*-ксилулозы вычисляют по следующей формуле:

$$\frac{E_0 - E_{конеч.}}{E_{станд.}} \cdot 0{,}10 \cdot \frac{0{,}35}{0{,}05} \cdot 1{,}22$$ *мкмолей D*-ксилулозы в *опыте (ферментативной реакционной смеси)*.

Фактор 0,10 учитывает, что реакция с цистеинкарбазолом была калибрована с 0,1 *мкмоля L*-рибулозо-*о*-нитрофенилгидразина, фактор 0,35 : 0,05 позволяет произвести пересчет с объема аликвоты, который был взят для реакции окрашивания на весь объем опыта; фактор 1,22 учитывает, что только 82% *D*-ксилулозы было превращено в ксилозу.

Определение D-ксилозы. В три пробирки отмеривают пипеткой следующие растворы:

Опыт	Контроль	Стандарт
0,15 *мл* боратного буферного раствора (5)	0,15 *мл* боратного буферного раствора (5)	0,15 *мл* боратного буферного раствора (5)
0,05 *мл* пробы, содержащей около 0,1 *мкмоля* *D*-ксилозы	0,05 *мл* пробы, содержащей 0,1 *мкмоля D*-ксилозы	0,05 *мл* раствора *D*-ксилозы (6), содержащих 0,1 *мкмоля D*-ксилозы
0,01 *мл* раствора фермента (8)	0,01 *мл* дистиллированной воды	0,01 *мл* раствора фермента (8)

Смешивают, инкубируют 1 час при 37°. Во все три смеси прибавляют по 0,8 *мл* дистиллированной воды, 6 *мл* H_2SO_4 (4), 0,2 *мл* раствора цистеингидрохлорида (2), 0,2 *мл* раствора карбазола (3); после каждого добавления смеси хорошо перемешивают. Оставляют стоять 2 часа при комнатной температуре, затем измеряют экстинкцию при 540 *ммк*.

Вычисление. Содержание *D*-ксилозы в опыте вычисляют по формуле:

$$\frac{E_v - E_k}{E_s - E_k} \cdot 0{,}1 =$$ *мкмолей D*-ксилозы в опыте,

где E_v — экстинкция опыта, E_k — экстинкция контроля, E_s — экстинкция стандарта.

[1] КФ 5.3.1.5.

Источники ошибок. Определению D-ксилозы мешает L-арабиноза, определению D-ксилулозы — L-рибулоза, так как препарат фермента постоянно содержит примесь L-арабинозоизомеразы [1]. Если в анализируемом материале имеются L-арабиноза или L-рибулоза, то пробу обрабатывают L-арабинозоизомеразой [2] и добавляют D-ксилозоизомеразу лишь тогда, когда первая реакция фермента уже закончена. В этом случае метод может служить для последовательного определения L-арабинозы и D-ксилозы или L-рибулозы и D-ксилулозы. Результаты определения D-ксилозы занижены, если ее слишком много (на 19%, если соотношение между D-ксилулозой и D-ксилозой равны 1 : 1). D-ксилоза сдвигает равновесие реакции с ксилозоизомеразой.

Если исследуемый материал не содержит L-арабинозы и L-рибулозы[3], то метод специфичен для D-ксилулозы и D-ксилозы. Точность метода 5%.

Определение D-рибулозы [4] [7]

Принцип. Рибитдегидрогеназа (РДГ) катализирует в присутствии дифосфопиридиннуклеотида обратимую реакцию окисления рибита в D-рибулозу:

$$\text{рибит} + \text{НАД}^+ \rightleftarrows D\text{-рибулоза} + \text{НАД-Н}_2.$$

Предлагаемая кажущаяся константа равновесия этой реакции составляет $7{,}17 \cdot 10^{-3}$ при pH 8,0 и 28°.

При избыточном количестве НАД-H_2 D-рибулоза практически превращается количественно в рибит при одновременном окислении эквивалентного количества НАД-H_2.

Реактивы (примерно 6 определений): 1) раствор восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (около 10^{-3} *М* НАД-H_2): 7,82 *мг* НАД-HNa_2 растворяют в бидистиллированной воде и доводят объем до 10 *мл*; 2) трис-буферный раствор (1,0 *М*; pH 7,4): 12,11 *г* трис-гидроксиметиламинометана растворяют примерно в 50 *мл* бидистиллированной воды, доводят 2 н. раствором HCl до pH 7,4 (стеклянный электрод) и разводят до 100 *мл*; 3) трис-буферный раствор (1,0 *М*; pH 8,5): 12,11 *г* трис-гидроксиметиламинометана растворяют примерно в 50 *мл* бидистиллированной воды, доводят 2 н. раствором HCl до pH 8,5 (стеклянный электрод) и разводят до 100 *мл*; 4) рибитдегидрогеназа, РДГ (около 1 *мг* белка на 1 *мл*).

При очистке фермента путем элюирования с геля фосфата кальция получают раствор, содержащий приблизительно 1 *мг/мл* [7]. Этот раствор содержит около 5 *ед* РДГ/0,1 *мл*.

---

[1] КФ 5.3.1.3.
[2] КФ 5.3.1.5.
[3] P. Stumpf et al. J. Biol. Chem., 1958, 231, 1031.
[4] Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

Раствор НАД-H_2 готовят еженедельно и сохраняют в замороженном виде. Трис-буферный раствор при 4° сохраняется неограниченное время. Раствор РДГ при 3° сохраняется дольше месяца. Повторное оттаивание и замораживание приводит к значительным потерям активности.

Техника. Измерение ведут при длине волны 340 *ммк*, в кварцевых кюветах толщиной 1 *см*, объем анализируемой жидкости 3 *мл*; сравнительная кювета содержит трис-буферный раствор (pH 8,5) вместо раствора фермента. Незначительная «собственная» абсорбция раствора фермента определяется особо.

Постановка опыта. Для кюветы с опытом и сравнительной кюветы берут: 3,0 *мл* пробы (около 0,1 *мкмоля* *D*-рибулозы на 1 *мл*), 1,5 *мл* НАД-H_2 (1), 3,0 *мл* трис-буферного раствора (2), 1,2 *мл* бидистиллированной воды. Полученную смесь доводят до комнатной температуры (около 25°). Отмеривают пипеткой в кювету с опытом : 1,9 *мл* смеси и 0,1 *мл* раствора РДГ (4); в сравнительную кювету: 2,9 *мл* смеси и 0,1 *мл* трис-буферного раствора (3), хорошо смешивая деревянной палочкой. Ожидают прекращения реакции (около 40—60 мин.). Измеряют экстинкцию E_1 (сравнительную кювету против кюветы опыта). Экстинкция ферментного раствора (E_2) определяется один раз для каждого препарата фермента, причем измеряют адсорбцию 0,1 *мл* ферментного раствора + 2,9 *мл* бидистиллированной воды против 0,1 *мл* трис-буферного раствора (pH 8,5) + 2,9 *мл* бидистиллированной воды.

Сумма $E_1 + E_e$ составляет изменение экстинкции ΔE_{340}, которое соответствует использованию НАД-H_2.

Вычисление. Реакция протекает стехиометрически, на 1 *моль* восстановленной *D*-рибулозы 1 *моль* НАД-H_2 переходит в НАД. Молярный коэффициент экстинкции НАД-H_2 при 30 *ммк* и pH 8,0 (при измерении) составляет 6,22 *см*^{2}/*мкмоль*. При этих условиях свыше 99% *D*-рибулозы превращается в рибит.

Концентрацию *D*-рибулозы в исследуемом материале вычисляют по формуле

$$1 \text{ мкмоль } D\text{-рибулозы на } 1 \text{ мл} = \frac{\Delta E_{340}}{6,22} \cdot 3 = \Delta E_{340} \cdot 0,482, \text{ или } 1 \text{ мкг}$$

$$D\text{-рибулозы на } 1 \text{ мл} = \frac{\Delta E_{340} \cdot 3 \cdot 150,13}{6,22} = \Delta E_{340} \cdot 72,41$$

(150,13 — мол. вес *D*-рибулозы).

Пример. При анализе было найдено: $E_1 = 0,196$; $E_e = 0,005$; $\Delta E_{340} = E_1 + E_e = 0,196 + 0,005 = 0,201$.

Таким образом, материал исследования содержал: 0,201 × × 0,482 = 0,0969 *мкмоля* *D*-рибулозы на 1 *мл* или 0,201 × 7,41 = = 14,55 *мкг* *D*-рибулозы на 1 *мл*.

Другие методы. *D*-рибулоза реагирует в присутствии рибулокиназы с аденозинтрифосфатом (АТФ), образуя *D*-рибулозо-5-фосфат и АДФ, который возникает в стехиометрическом количестве и может быть ферментативно определен [8].

Определение *L*-рибулозы и *L*-арабинозы [1] [9]

Принцип. *L*-арабинозоизомераза [2] катализирует превращение:

L-рибулоза ⇄ *L*- арабиноза.

Равновесие лежит в направлении образования *L*-арабинозы, константа равновесия составляет 7,33 при 34°. В присутствии избыточного количества изомеразы *L*-рибулоза превращается на 88% в *L*-арабинозу. *L*-арабиноза не дает реакции с цистеинкарбазолом. Если этот тест окрашивания проводят до и после инкубации с *L*-арабинозоизомеразой, то разница интенсивностей окрашивания соответствует 88% содержащейся в пробе *L*-рибулозы. Реакцию калибруют *L*-рибулозо-*о*-нитрофенилгидразином.

Тот же способ может служить для определения *L*-арабинозы, если реакция происходит в боратном буферном растворе (pH 8,2) вместо трис-буферного раствора (pH 7,5); при pH 8,2 равновесие указанной реакции направлено в сторону образования кетопентозы. В качестве стандарта применяют кристаллическую *L*-арабинозу.

Реактивы: см. определение *D*-ксилулозы и *D*-ксилозы (стр. 139), но реактивом 6 здесь служит *L*-арабиноза, стандартный раствор ($2 \cdot 10^{-3}$ *М*): 0,3 *мг* *L*-арабинозы растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 1 *мл*; 8) *L*-арабинозоизомераза (6 *мг* белка на 1 *мл*); фермент соответственно разбавляют трис-буферным раствором 0,5 *М* (pH 7,5).

Относительно устойчивости реактивов — см. определение *D*-ксилулозы и *D*-ксилозы (стр. 139).

Техника. Относительно подготовки исследуемой пробы — см. определение *D*-ксилулозы и *D*-ксилозы.

Определение L-рибулозы. Отмеривают пипеткой в маленькую пробирку, конически сужающуюся книзу, 0,30 *мл* трис-буферного раствора (1), 0,04 *мл* пробы (содержащей около 2 *мкмолей* *L*-рибулозы), смешивают, отбирают 0,05 *мл*, к оставшемуся количеству смеси добавляют 0,01 *мл* раствора *L*-арабинозоизомеразы (8), инкубируют при 23° и каждые 20 мин. берут еще по 0,05 *мл* пробы. Каждую из этих 0,05-миллилитровых проб (P_0, P_1, P_2) соединяют с 0,95 *мл* дистиллированной воды и 6 *мл* H_2SO_4 (4), основательно смешивают, добавляют 0,2 *мл* раствора цистеина (2), перемешивают и добавляют 0,2 *мл* раствора карбазола (3). Растворам дают стоять 1 час при комнатной температуре, затем наливают в 1-сантиметровые кюветы, измеряют экстинкции всех проб (P_0, P_1, P_2), обработанных таким способом, при длине волны 540 *ммк* (E_0, E_1, E_2... $E_{конеч}$). Все пробы, взятые через 40 мин., должны дать одинаковую конечную экстинкцию ($E_{конеч}$).

---

[1] Метод можно использовать и для анализа растительного материала.
[2] КФ 5.3.1 3.

Вычисление. Содержание L-рибулозы вычисляют по формуле:

$$\frac{E_0 - E_{\text{конеч.}}}{E_{\text{станд.}}} \cdot 0{,}1 \cdot \frac{0{,}35}{0{,}05} \cdot 1{,}14 \textit{ мкмолей } L\text{-рибулозы в опыте.}$$

Фактор 0,1 учитывает, что реакция с цистеинкарбазолом была калибрована с 0,1 *мкмоля* L-рибулозо-*о*-нитрофенилгидразина. Фактор 0,35 : 0,05 позволяет производить пересчет с объема аликвоты, которая была взята для реакции окрашивания, на полный объем опыта. Фактор 1,14 учитывает, что только 88% L-рибулозы было превращено в L-арабинозу.

Вместо L-рибулозо-*о*-нитрофенилгидразина реакцию с цистеинкарбазолом можно калибровать также и с L-арабинозой. В этом случае поступают, как описано при определении L-рибулозы, но вместо пробы 0,04 *мл* раствора берут 0,25 *М* L-арабинозы (соответственно 10 *мкмолей* L-арабинозы) и только в конце реакции (приблизительно через 40 мин. после добавления фермента[1]) берут пробы по 0,05 *мл*. После достижения равновесия 0,05 *мл* аликвота опыта содержит 0,15 *мкмолей* L-рибулозы.

Для вычисления результатов опыта применяют формулу

$$\frac{E_0 - E_{\text{конеч.}}}{E_{\text{станд.}}} \cdot 0{,}15 \; \frac{0{,}35}{0{,}05} \cdot 1{,}14 \textit{ мкмолей } L\text{-рибузолы в опыте.}$$

Определение L-арабинозы. В три пробирки отмеривают пипеткой следующие растворы:

Опыт	Контроль	Стандарт
0,15 *мл* боратного буферного раствора (5)	0,15 *мл* боратного буферного раствора (5)	0,15 *мл* боратного буферного раствора (5)
0,05 *мл* пробы, содержащей около 0,1 *мкмоля* L-арабинозы	0,05 *мл* пробы, содержащей около 0,1 *мкмоля* L-арабинозы	0,05 *мл* раствора L-арабинозы (6), содержащего 0,1 *мкмоля* L-арабинозы
0,01 *мл* раствора фермента (8)	0,01 *мл* дистиллированной воды	0,01 *мл* раствора фермента (8)

Смешивают, инкубируют в течение 1 часа при 37°, во все три смеси добавляют по 0,8 *мл* дистиллированной воды, 6 *мл* раствора H_2SO_4 (4), 0,2 *мл* раствора цистеина (2), 0,2 *мл* раствора карбазола (3), хорошо смешивая после добавления каждого реактива. Оставляют 20 мин. при комнатной температуре, затем измеряют экстинкцию при длине волны 540 *ммк*.

Вычисление. Содержание L-арабинозы в опыте вычисляют по формуле

$$\frac{E_o - E_k}{E_s - E_k} \cdot 0{,}1 \textit{ мкмолей } L\text{-арабинозы в опыте,}$$

где E_o — экстинкция опыта, E_k — экстинкция контроля, E_s — экстинкция стандарта.

[1] КФ см. стр. 144.

Источники ошибок. Кроме L-рибулозы и L-арабинозы, никакие другие соединения не реагируют с L-арабинозоизомеразой. Поэтому метод может служить для определения и идентификации обоих сахаров.

Значения, полученные для L-рибулозы, занижены, когда присутствует много L-арабинозы (14%), когда соотношение L-рибулоза : L-арабиноза — 1 : 1. Отклонения при определении L-арабинозы, вызванные присутствием L-рибулозы и других кетоз, учитываются контролем. Точность метода около 5%.

Определение D-глюкозы[1] [10]

Принцип. Гексокиназа[2] катализирует фосфорилирование глюкозы аденозинтрифосфатом (АТФ):

$$\text{глюкоза} + \text{АТФ} \rightarrow \text{глюкозо-6-фосфат} + \text{АДФ}, \quad (1)$$

Глюкозо-6-фосфат окисляется в присутствии никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФ) глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназой[3].

$$\text{глюкозо-6-фосфат} + \text{НАДФ}^+ \rightarrow \text{6-фосфоглюконовая кислота-}\delta\text{-лактон} + \text{НАДФ-Н} + \text{H}^+. \quad (2)$$

Обе реакции практически протекают стехиометрически и количественно. Правда, при особых условиях они могут быть и обратимыми [9]. НАДФ-H_2, образующийся по уравнению (2), определяют спектрофотометрически при длине волны 340 или366 *ммк*; он служит мерой для количества глюкозо-6-фосфата, полученного по уравнению (1) из глюкозы.

Реактивы: 1) раствор сульфата цинка (около 4,5% в/о $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$): около 4,5 *г* $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ растворяют в воде и доводят объем до 100 *мл*; 2) раствор гидроокиси бария (около 0,15 *М*): около 4,7 *г* $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$ растворяют в 100 *мл* воды и сохраняют защищенным от CO_2 (бутыль закупоривают пробкой с натронноасбестовой трубкой); чтобы удобно было брать небольшие количества раствора, лучше его сохранять в специальной колбе; 3) трис-буферный раствор (около 0,1 *М*, pH 8,0): около 0,21 *г* трис-гидроксиметиламинометана (перекристаллизованного) и 5,36 *мл* 1,0 н. раствора HCl растворяют в воде и доводят объем до 100 *мл*; 4) раствор хлористого магния (около 0,1 *М*): около 0,5 *г* $MgCl_2 \cdot H_2O$ растворяют в 25 *мл* воды; 5) сывороточный альбумин; а) около 20 *мг* кристаллического альбумина сыворотки растворяют в 5 *мл* воды (он служит защитным белком для гексокиназы при высоком разведении); б) раствор *а* разводят водой в 40 раз; 6) раствор аденозинтрифосфатв (около 0,01 *М* АТФ): около 60 *мг* АТФ-$Na_2H_2 \cdot 3H_2O$ растворяют а

[1] Метод можно использовать и для анализа растительного материала.
[2] Гексокиназа; КФ 2.7.1.1.
[3] Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа; КФ 1.1.1.49.

10 *мл* воды; 7) никотинамидадениндинуклеотидфосфат (около 3×10^{-3} *M* раствора НАДФ): около 13 *мг* НАДФ-NaH_2 растворяют в 5 *мл* воды; 8) гексокиназа, ГК (около 300 BSCC — ед. [9а] или 140 [9б] [1] *ед/мл*); 1 ед. BSCC катализирует фосфорилирование около 10 *мкг* глюкозы в 1 мин. при 30° и pH 8,0; 1 *мг* кристаллического фермента — белка (3000 ед. BSCC) или его эквивалента разводят 10 *мл* раствора альбумина сыворотки (5, б); присутствие альбумина сыворотки в качестве защитного белка, особенно при менее чистых препаратах фермента, необязательно; однако оно становится необходимым при высоком разведении в системе опыта; 9) глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа (см. [30] и [31]) (около 2 ед. КМ или 1 ед. ГБ [2] на 1 *мл*); 1 ед. ГБ катализирует дегидрирование 1 *мкмоля* глюкозо-6-фосфата в 1 мин. при 25° и pH 8,0. 0,1 *мг* очищенного фермента (7 ед. ГБ или 1 экв. этого количества растворяют в воде и доводят объем до 7 *мл*).

Растворы неорганических реактивов могут хорошо сохраняться закупоренными при комнатной температуре. Буферный раствор хранят при 5°, его можно применять до тех пор, пока не будет обнаружен рост бактерий. Препараты лиофилизированной гексокиназы Г-6-Ф-ДГ (см. стр. 659) сохраняют свою активность долгое время, если их хранить в эксикаторе при 5°. Ферментные растворы сохраняются при —15° несколько недель без особой потери активности. Их следует осторожно подвергать оттаиванию, не встряхивая сильно, и ставить на лед во время употребления. Остальные растворы сохраняются при —15° долгое время.

Техника. *Подготовка исследуемого материала.* Метод пригоден для определения глюкозы в крови, плазме, сыворотке, а также в экстрактах ткани или ферментных системах, которые образуют или используют глюкозу. В дальнейшем в качестве примера будет описано определение глюкозы в крови.

Осаждение белков. Осаждение белков при помощи Ba $(OH)_2$ и $ZnSO_4$ было разработано для приготовления проб крови при определении остаточного сахара. Осторожно применяя оба реактива, из исследуемого материала можно удалить белок и сложные эфиры фосфорной кислоты. Большое количество $ZnSO_4$ ингибирует ферментную систему пробы (опыта), избыток Ba $(OH)_2$ приводит к неполному осаждению белков, что в крови или сыворотке можно обнаружить по появлению пены при встряхивании пробы или по появлению гемоглобина и мути в надосадочной жидкости центрифугированной пробы. Если исследуемый материал содержит ионы, которые образуют вместе с $ZnSO_4$ или Ba $(OH)_2$ осадок, то отношение обоих реактивов следует выбирать так, чтобы потери были компенсированы. Концентрации растворов Ba $(OH)_2$ и $ZnSO_4$ должны

---

[1] Единица BSCC равна единице Бергера и др. [9а]; единица КМ равна единице Купица и Макдональда [9б].

[2] Единица К равна единице Корнберга (A. Kornberg. J. Biol. Chem., 1950, 182, 805); единица ГБ равна единице Глезер-Брауна (L. Glaser a. D. Brown. J. Biol. Chem., 1955, 216, 67).

быть установлены таким образом, чтобы после центрифугирования смеси равных объемов этих реактивов разбавленной водой в 10 раз, ее надосадочная жидкость являлась бы нейтральной (pH 7). Отношение $ZnSO_4 : Ba(OH)_2$ при осаждении белков может колебаться приблизительно от 1 : 1 до 1 : 1,1, так чтобы pH надосадочной жидкости составил около 7,0—7,5 (стеклянный электрод), что не мешает ферментативному определению глюкозы. Однако рекомендуется тщательно проверить в контрольном опыте с добавленной глюкозой, не ингибирует ли проба с осажденными белками ферментную систему. Измерение конечного значения экстинкции нельзя слишком задерживать. Результаты определения глюкозы ферментным методом, по-видимому, на 10% меньше, чем при анализе проб с осажденными белками по методу восстановления меди (см. [10]). Это следовало бы отнести за счет присутствия других редуцирующих веществ в крови, ибо со стандартным раствором глюкозы оба метода определения дают одинаковые результаты.

Подготовка материала. В пробирке смешивают 0,1 *мл* крови и 1,5 *мл* дистиллированной воды, добавляют 0,2 *мл* раствора $Ba(OH)_2$ (2), хорошо смешивают и добавляют 0,2 *мл* раствора $ZnSO_4$ (1).

После основательного помешивания центрифугируют около 5 мин. при 500 *g* (примерно). Надосадочная жидкость должна быть прозрачной и бесцветной. Если поверхность жидкости покроется пленкой, ее фильтруют или отсасывают пробу пипеткой, кончик которой обвернут ватным тампоном.

Из биологического материала или ферментных реактивных смесей, в которых следует определить фосфаты сахара и свободные сахара, можно осаждать белки таким количеством $HClO_4$, чтобы ее концентрация в исследуемом материале в конце концов составляла 3—5% в/в. Надосадочную жидкость нейтрализуют раствором KOH и, таким образом, удаляют бо́льшую часть хлорной кислоты в виде нерастворимого $KClO_4$. Трихлоруксусная кислота в данном случае не пригодна для осаждения белков, так как ион трихлорацетата ингибирует Г-6-Ф-ДГ. В некоторых случаях, однако, возможно экстрагировать бо́льшую часть трихлоруксусной кислоты из пробы с осажденными белками эфиром или разрушить ее кипячением, поскольку разложение веществ, чувствительных к кислотам или нагреванию, не мешает последующему определению глюкозы.

При осаждении белков одинаковым объемом 2,5%-ного раствора (в/о) $HgCl_2$ в 0,5 н. растворе HCl (реактив Шенка, см [11]), с последующей фильтрацией, обработкой H_2S, фильтрацией, удалением H_2S и нейтрализацией, фосфаты сахара не удаляются, однако выпадающая HgS адсорбирует такие полисахариды, как гликоген.

Примерно 0,2 частями объема другого ртутного реактива (реактив West'a[1]: 28% (в/в) $Fe_2(SO_4)_3 \cdot H_2O$ + 34% $HgSO_4$ в 1,5 н. растворе H_2SO_4) можно удалить белки, полисахариды и гексозофосфаты, если к смеси из реактива и материала исследования прибавлять

[1] См. A. Steiner. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1935, 32, 968.

при сильном встряхивании твердый $BaCO_3$ до тех пор, пока раствор не станет нейтральным против бумаги с бромтимоловой синью; фильтрат подкисляют каплей H_2SO_4, обрабатывают H_2S, фильтруют, удаляют H_2S и нейтрализуют.

Постановка опыта (предварительные замечания). Для того чтобы точно дозировать реактивы, применяют пипетки с вытянутым отшлифованным кончиком. Растворы смешивают тонкой стеклянной палочкой с плоским диском на одном конце. Если по какой-либо причине необходимо загружать больше 1,2 *мл* исследуемого материала, то концентрации растворов реактивов можно соответственно повысить. Растворы 3 и 4 можно соединить в один для нескольких определений. Вместо трис-буферного раствора (ионы фосфата ингибируют Г-6-Ф-ДГ) можно применять вероналовый и глицилглициновый буферный растворы. Измерение ведут при длине волны 340 *ммк*, толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 3,0 *мл*.

Растворы отмеривают пипеткой в приведенной ниже последовательности и до прибавления ферментов хорошо смешивают: 1,2 *мл* исследуемого материала (без белков) или дистиллированной воды, 1,0 *мл* буферного раствора (3), 0,2 *мл* раствора $MgCl_2$ (4), 0,1 *мл* раствора альбумина (5а), 0,1 *мл* раствора АТФ (6), 0,1 *мл* раствора гексокиназы (8), 0,1 *мл* реактива Г-6-Ф-ДГ (9).

После добавления ферментов снова помешивают и измеряют начальную экстинкцию E_1 против воды. Добавляют 0,2 *мл* раствора НАДФ (7), смешивают и через промежутки в 1 мин. измеряют экстинкцию, пока не будет достигнуто стабильное конечное значение E_2. Поскольку в контрольном опыте было установлено, что экстинкция после достижения определенного максимального значения в течение известного отрезка времени больше не уменьшается, можно одновременно проводить несколько определений и измерять конечные значения их экстинкций в установленное время.

Вычисление. Начальная экстинкция E_1 в первую очередь исправляется умножением на (2,8:3,0) для учета изменения объема добавлением раствора НАДФ. Если в контрольном опыте, с дистиллированной водой вместо пробы, наблюдали подъем экстинкции после добавления раствора НАДФ, то его величину нужно прибавить к исправленной E_1. Полученное таким образом значение E_1 вычитают из конечного значения экстинкции E_2. Разницу ΔE делят на 0,0115, чтобы выявить количество (в *мкг*) глюкозы в 3 *мл* пробы опыта. Делитель 0,0115 вычисляется из молекулярного веса глюкозы и коэффициента экстинкции для НАДФ-H_2 ($\varepsilon = 6{,}22 \cdot 10^6$ $см^2/M$ при толщине слоя 1 *см* и длине волны 340 *ммк*), который соответствует в 3 *мл* экстинкции 2,07 на 1 *мкмоль* НАДФ-H_2 или фосфорилированной глюкозы.

Пример. Кровь кролика была очищена от белков, как описано выше, так что образовался раствор, разведенный 1 : 20. Из него было взято для определения 0,2 *мл* (+1,0 *мл* дистиллированной воды), E_1 до добавления раствора НАДФ равна 0,018. Поправка

на добавление 0,2 *мл* раствора НАДФ

$$\frac{2,8}{3,0}\cdot 0,018 = 0,017.$$

В предварительном опыте с водой вместо исследуемого материала найденное увеличение экстинкции после добавления НАДФ составляло 0,010. Тогда

$$E_1 = 0,017 + 0,010 = 0,027.$$

Конечное значение экстинкции $E_2 = 0,142$,

$$\Delta E = E_2 - E_1 = 0,142 - 0,027 = 0,115.$$

$$\frac{0,115}{0,0115} = 10 \text{ мкг глюкозы на 0,2 мл крови, разведенной 1:20.}$$

Это соответствует 1 *мг* глюкозы на 1 *мл* цельной крови, или 100 *мг*%.

В приведенных условиях измеряемое количество глюкозы зависит от концентрации НАДФ, 0,2 *мл* (см. выше) раствора которого должно бы хватить для определения 0,6 *мкмоля* (108 *мкг*) глюкозы. Правда, при этом получение конечного значения экстинкции было бы сильно замедлено, так как ферменты не насыщены больше НАДФ и АТФ. Кроме того, E_2 лежало бы в области шкалы фотометра, которая не допускает точного измерения. Напротив того, от 5 *мкг* ($E = 0,057$ примерно в 5 мин.) до 60 *мкг* ($\Delta E = 0,690$ примерно в 20 мин.) глюкозы получают пригодные значения E_2. С большим количеством НАДФ, АТФ и фермента границы определений могут быть расширены. Работая с большими количествами фермента, можно также ускорить установление конечного значения экстинкции.

Без гексокиназы[1] или АТФ система может служить для определения глюкозо-6-фосфата. Другие гексозомонофосфаты (глюкозо-1-фосфат, фруктозо-6-фосфат, маннозо-6-фосфат) можно анализировать, если добавлять достаточные количества соответствующих вспомогательных ферментов, а именно фосфоглюкомутазу[2], фосфоглюкозоизомеразу и фосфоглюкозу. Точность метода 5%.

Определение D-глюкозы [11]

П р и н ц и п. Глюкозооксидаза[3] (ГО) катализирует реакцию:

$$\beta\text{-}D\text{-глюкоза} + H_2O + O_2 \rightarrow D\text{-глюконовая кислота} + H_2O_2.$$

Сначала образуется глюконолактон, который спонтанно гидролизуется в *D*-глюконовую кислоту. Перекись водорода разлагается в индикаторной реакции пероксидазой[4], освобожденный кислород

[1] КФ 2.7.1.1
[2] КФ 2.7.5.1.
[3] КФ 1.1.3.4.
[4] КФ 1.11.1.7.

окисляет донатор водорода DH_2 (например, *о*-дианизидин) в окрашенное соединение D:

$$H_2O_2 + DH_2 \rightarrow 2H_2O + D.$$

Количество красителя D, образовавшегося из DH_2, является мерилом превращений глюкозы. Спектр абсорбции красителя, образующегося из *о*-дианизидина, имеет широкий максимум при 460 *ммк*. Коэффициент экстинкции зависит от условий опыта; поэтому измеренную экстинкцию постоянно относят к экстинкции стандартного раствора глюкозы; измеряют при 436 *ммк* или соседней (до 440 *ммк*) длине волны.

Реактивы (все реактивы изготовляют на свежей дважды дистиллированной воде): 1) буферный раствор, ферментативная смесь (0,12 *М* раствор фосфата, pH 7,40, 1 *мкг* порошка пероксидазы на 1 *мл*; 250 *мкг* ГО на 1 *мл*): 2,07 *г* $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ + 1,09 *г* $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ + 6 *мг* пероксидазы + 38 *мг* глюкозооксидазы растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 150 *мл*; 2) хромоген (5 *мг* *о*-дианизидингидрохлорида на 1 *мл*): 10 *мг* *о*-дианизидингидрохлорида растворяют в 2 *мл* дистиллированной воды; 3) реактив на глюкозу: при сильном помешивании на каждые 50 *мл* реактива *1* добавляют по 0,5 *мл* раствора 2; смесь сохраняют в темной склянке; ее устойчивость может быть повышена добавлением нескольких капель хлороформа; 4) стандартный раствор глюкозы (91 *мкг* *D*-глюкозы на 1 *мл*): продажная глюкоза содержит около 9% воды; 100 *мг* глюкозы растворяют с добавлением 25 *мл* хлорной кислоты (плотность равна 1,67; около 70%) в дистиллированной воде и по растворении объем доводят до 1000 *мл*; для каждой навески глюкозы концентрацию раствора проверяют один раз гексокиназой и промежуточным ферментом; 5) хлорная кислота (около 0,34 *М*): 2,9 *мл* 70%-ной кислоты разводят бидистиллированной водой до 100 *мл*.

Реактив на глюкозу изготовляют ежедневно свежим. Для этого раствор 1 не берут пипеткой, а отмеривают мерным цилиндром. Если раствор 3 помутнеет, то его следует фильтровать. Хотя стандартный раствор глюкозы защищен хлорной кислотой от микроорганизмов, его хранят в холодильнике (сохраняется больше года).

Техника. *Подготовка исследуемого материала*. Кровь, как обычно, берут пипеткой для определения сахара в крови из мочки уха. Венозную кровь анализируют по возможности свежей. Гемолиз не мешает этому. Добавления нитрата, оксалата, флуорида, этилендиаминтетраацетата в обычных концентрациях не оказывают измеримого влияния на результат определения. По не выясненным до настоящего времени причинам обнаруживают примерно на 10 *мг*% глюкозы больше, если надосадочная жидкость после осаждения белков нейтрализуется хлорной кислотой. Таким образом, этого следует избегать. Осаждение белков сульфатом цинка — раство-

ром едкого натра — можно проводить без каких-либо осложнений: получают те же значения, как и после осаждения белков хлорной кислотой без нейтрализации. Осаждение белков можно проводить также трихлоруксусной кислотой. Если проба крови не может быть тотчас переработана, то ее отмеривают пипеткой в раствор хлорной кислоты (5). Затем ее центрифугируют и декантируют прозрачную надосадочную жидкость. Она может сохраняться в холодильнике до следующего дня. При более продолжительном стоянии кислого раствора полисахариды, содержащиеся в пробе, медленно гидролизуются, и тогда получают завышенные значения глюкозы. В надосадочной жидкости после осаждения белков можно найти увеличение содержания глюкозы приблизительно на 6% за 24 часа. Если после осаждения белков пробу не центрифугируют, то увеличение составляет около 10% за 24 часа.

Если пробы тотчас перерабатывают, то не надо осаждать белки, пробы разводят бидистиллированной водой 1 : 10. Моча, даже содержащая немного белка, не требует осаждения белков. Редуцирующие вещества, как, например, аскорбиновая кислота, мочевая кислота, глютатион, креатин и другие, должны быть удалены, так как они могут помешать анализу. Для этого авторы применяют анионные и катионные смолы, приготовляя и регенерируя иониты: анионит обрабатывают 5%-ным раствором NaOH, катионит амберлит JR120—5%-ным раствором HCl и промывают каждый раз дистиллированной водой до нейтральной реакции воды. Затем помещают в стеклянную трубку (длиной 10 *см*, диаметром 1 *см*, со стеклянным краном внизу) ватную пробку, около 3 *мл* амберлита JRA 120, около 3 *мл* амберлита J RA400 и прибавляют столько дистиллированной воды, чтобы была покрыта поверхность ионитов.

0,5 *мл* мочи вводят в колонку и дают стекать по 5 капель в 1 мин. в 50-миллилитровую измерительную колбу. При этом в колонку вводят столько дистиллированной воды, чтобы ионит оставался покрытым водой. После того как стечет приблизительно 20 *мл*, повышают скорость до 50—100 капель в 1 мин. (промывание ионита дистиллированной водой). Всего собирают 50 *мл* и хорошо смешивают в мерной колбе. Из этой деионизованной, разведенной 1 : 100 мочи анализируют 2 *мл*. Приведенное количество ионитов достаточно для удаления по меньшей мере 5 *мг* аскорбиновой кислоты и глютатиона, а также $>$ 0,3 *мг* мочевой кислоты (что соответствует обычным концентрациям этих веществ в моче). Потерь глюкозы не обнаруживается.

Продукты питания (в зависимости от содержания белка, поскольку последний обусловливает окраску пробы) подвергают предварительно операции осаждения белков так же, как кровь.

Осаждение белков. В 10-миллилитровую центрифужную пробирку отмеривают последовательно пипеткой: 1,00 *мл* хлорной кислоты (5) и 0,10 *мл* пробы (например, крови). Пипетку прополаскивают несколько раз, смесь хорошенько помешивают тонкой стеклянной палочкой, центрифугируют 5—10 мин. по меньшей мере

при 3000 *об/мин*, затем сливают прозрачную надосадочную жидкость в сухую пробирку и анализируют 0,20 *мл*.

Постановка опыта. Измерение ведут при длине волны 436 *ммк* (430—480 *ммк*); толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 5,2 *мл*, температура комнатная. В каждой серии опытов анализируют один слепой опыт и стандартные растворы глюкозы.

Реактив на глюкозу (3) до употребления доводят до комнатной температуры. В каждую пробирку отмеривают пипеткой последовательно: *слепой опыт* — 5,00 *мл* реактива на глюкозу (3), 0,20 *мл* дистиллированной воды; *стандартный раствор глюкозы* — 5,00 *мл* реактива на глюкозу (3), 0,20 *мл* стандартного раствора глюкозы (4); *проба* — 5,00 *мл* реактива на глюкозу (3), 0,20 *мл* очищенной от белка пробы; все это хорошо смешивают и оставляют на 30—40 мин. при 20—22°. Для измерения растворы выливают в кюветы. Экстинкции $E_{пробы}$ и $E_{станд}$ измеряют против контрольного (слепого) опыта.

Серийные измерения проводят по времени так (например, добавление реактива на глюкозу через промежутки в 1 мин.), чтобы было гарантировано среднее время инкубации в 35 мин.

Вычисление. Калибровочные кривые проходят линейно приблизительно до 80 *мкг* (около 0,45 *мкмоля*) глюкозы в опыте; это соответствует концентрации сахара в крови примерно 450 *мг*%. При экстинкциях свыше 0,600 (измеренных против контрольного, слепого опыта) точность отсчета на фотометре слишком мала. В этом случае пробу или надосадочную жидкость после осаждения белков разводят бидистиллированной водой и снова анализируют.

Для вычисления исходят из экстинкции стандартного раствора глюкозы. Последний содержит 18,2 *мкг* глюкозы на опыт, что при приведенном осаждении белков соответствует 1 *мг* глюкозы на 1 *мл* крови или сыворотки.

$$\frac{E_{пробы}}{E_{станд.}} \cdot 100 = мг\ \%\ \text{глюкозы в крови или сыворотке.}$$

При анализе проб с неосажденными белками следует учитывать предварительные разведения и объем пробы 0,20 *мл*. Вообще

$$\frac{E_{пробы} 5 \cdot 0{,}0182 \times \text{фактор разведения}}{E_{станд.}} =$$

$$= \frac{E_{пробы} \cdot 0{,}091 \times \text{фактор разведения}}{E_{станд.}} = мг\ \text{глюкозы на 1}\ мл\ \text{пробы,}$$

где 5 — перечисление 0,2 *мл* на 1 *мл*, 0,0182 — *мг* глюкозы в стандартном опыте.

Пример. Кровь (0,1 *мл*), взятая утром; белки осаждаются, а прозрачная надосадочная жидкость переливается в пробирку.

Вычисление.

$$E_{пробы} = 0{,}104; \quad E_{станд} = 0{,}170$$

$$\frac{0{,}104}{0{,}170} \cdot 100 = 61 \text{ мг \% глюкозы}$$

Модификация. Более точное измерение. Несмотря на измерение против контрольного (слепого) опыта, калибровочные кривые глюкозы сравнительно часто не проходят через нулевую точку координат, а пересекают ординату. Отрезок ординаты может составлять, в зависимости от препарата фермента, вплоть до $E = 0{,}060$. При содержании в пробе глюкозы, которое сильно отклоняется от обычной нормы (около 100 *мг*%), этот сдвиг калибровочной кривой приходится учитывать. Для точных измерений в таких случаях недостаточно относить экстинкцию главного опыта к экстинкции стандартной. Вместо анализа одного стандарта с 0,20 *мл* раствора 4, следует брать три или четыре пробы с 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 *мл* стандартного раствора (4); экстинкции, измеренные против контрольного (слепого) опыта, наносят на ординату против количеств глюкозы (абсцисса). Количества глюкозы, соответствующие экстинкции проб, берут из этой калибровочной кривой.

Источники ошибок. Определение специфично для *D*-глюкозы. Манноза, альтроза и галактоза показывают только около 1% значений глюкозы. Фруктоза, лактоза, раффиноза, мальтоза, арабиноза, ксилоза, сорбоза, инозит, мелибиоза, сахароза, α-метилглюкозид и фосфорилированный сахар не реагируют. Если принять скорость реакции с β-глюкозой за 100, то скорость реакции с другими сахарами составит: α-глюкоза — 0,64, манноза — 0,98, альтроза — 0,16, галактоза — 0,14, талоза — 0,015, аллоза — 0, гулоза — 0, идоза — 0,018, 6-метилглюкоза — 1,85, 4,6-диметилглюкоза — 1,22, 2-дезоксиглюкоза — 25, 6-дезокси-6-фторглюкоза > 3, ксилоза $> 0{,}4$.

Если проба содержит дисахариды (например, сироп крахмала), то анализ нарушается, когда ГО содержит в качестве загрязнений ферменты, расщепляющие дисахариды (например мальтазу[1], сахаразу [2], лактазу, амилазу [3]), которые освобождают глюкозу. Реакция тогда не прекращается, экстинкция непрерывно увеличивается.

Нарушения вследствие незначительных увеличений экстинкции могут быть устранены; отсчитывают экстинкции через промежутки в 5—10 мин. и экстраполируют против нулевого времени. Определение глюкозы в моче нарушается, когда проба содержит слишком много редуцирующих веществ (например, витамина С, мочевой кислоты); 25 *мг*% аскорбиновой кислоты снижают, например, конечное значение на 15%. Эти вещества конкурируют с пероксидазой за образующуюся перекись водорода. Точно так же конкурирует

[1] КФ 3.2.1.20.
[2] КФ 2.1.2.6.
[3] КФ 2.3.1.23.

и каталаза (возможные загрязнения в препарате ГО). Калибровочные кривые в таких случаях изогнуты даже при относительно низких значениях глюкозы. Добавление 1—3 *г* фторида, оксалата или формальдегида к 100 *мл* крови мешает определению: с течением времени после их прибавления обнаруживается больше глюкозы. Одновременно добавление двух из этих веществ в количествах 0,1% значительно завышает результаты определения глюкозы. Причина этого еще неизвестна. Точность метода около 5%. Модификацию см. также [26].

В. К. Городецкий предложил модификацию методики Миддлтона и Гриффитса и Маркса. Небольшие изменения метода связаны главным образом с особенностями применяемого отечественного препарата фермента глюкозооксидазы[1] [12].

Реактивы: 1) 0,9%-ный раствор хлористого натрия; 2) 5%-ный раствор $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 3) 0,3 н. раствор едкого натра; 4) 1%-ный раствор орто-толидина в абсолютном спирте. Продажный орто-толидин очищают перекристаллизацией из горячего абсолютного спирта добавлением дистиллированной воды с последующим отсасыванием выпавших кристаллов на воронке Бюхнера и дальнейшим высушиванием орто-толидина в вакуум-эксикаторе.

Хранение буфера и хромогена, лучшим из которых признан *о*-дианизидин солянокислый, производится при +4° в темных склянках. Отмеривают хромогены, инкубируют в бане и отсчитывают на приборе при 450 *ммк* в затемненном месте. Рабочую смесь буфер-фермент готовят ежедневно; хромоген к ней прибавляют непосредственно перед определением каждой серии, которая не должна превышать 15 проб. Оптимальное значение pH буферной смеси 6,7—6,9. Инкубацию исследуемых проб (опытных и контрольных) проводят в водяной бане в течение 30 мин. при 37°; 5) раствор 0,25 н. ацетатного буфера, pH 4,8. При данном pH наблюдается наибольшая стабилизация окраски при окислении орто-толидина; 6) кристаллическая пероксидаза[2] из хрена, 20 *мг*%-ный раствор в ацетатном буфере (5). Вместо кристаллической пероксидазы можно использовать пероксидазу из хрена, полученную по методике, описанной в руководстве Белозерского и Проскурякова; 7) препарат фермента глюкозооксидазы[3], полученной по методу, разработанному Гулым и Дегтяр из отечественного антибиотика «микроцид», выпускаемого Институтом микробиологии, санитарии и гигиены, г. Львов; 8) рабочий реактив для определения глюкозы энзиматическим методом готовится следующим образом: к 80 *мл* ацетатного буфера (5) добавляют 2 *мг* препарата глюкооксидазы (7) и 5 *мл* раствора пероксидазы (6) или 1 *мг* сухой кристаллической пероксидазы. Смесь перемешивают, приливают 1 *мл* раствора орто-толидина (4) и доводят объем ацетатным буфером (5) до 100 *мл*. Реактив готовится за 1—2 часа до употребления и может храниться на холоде

---

[1] КФ 1.1.3.4.
[2] КФ 1.11.1.7.
[3] КФ 1.1.3.4.

в темных закрытых склянках в течение нескольких суток; 9) стандартные растворы глюкозы: 50, 100 и 150 *мг%* готовятся на насыщенном водном растворе бензойной кислоты. Такие растворы можно хранить в холодильнике в закрытых склянках длительное время.

Техника. В центрифужных пробирках смешивают 1,1 *мл* раствора хлористого натрия (1) и 0,4 *мл* раствора сернокислого цинка (2) и 0,4 *мл* раствора едкого натра (3). К смеси добавляют 0,1 *мл* крови или по 0,1 *мл* стандартных растворов глюкозы (9), перемешивают и центрифугируют примерно при 2,5—3 тысячах *об/мин* в течение 10—15 мин. На определение берется 1 *мл* надосадочной жидкости, к нему приливают 3 *мл* реактива для определения глюкозы (8) и осторожно перемешивают содержимое пробирки. Для контроля берется 1 *мл* дистиллированной воды, к которой приливается 3 *мл* реактива (8).

В ходе реакции интенсивность окраски постепенно возрастает и достигает максимума через 13—20 мин. после прибавления рабочего реактива (8) к глюкозе при комнатной температуре. Далее интенсивность окраски остается неизменной в течение нескольких минут, а затем начинает медленно падать. Поэтому для получения точных результатов измерения развивающейся синей окраски необходимо проводить на фотоэлектроколориметре с красным светофильтром строго через 15—20 мин. после добавления рабочего реактива при температуре 20°.

Стандартную кривую, по которой отсчитывается количество сахара в кривой, необходимо строить для каждой серии определений, благодаря чему исключается незначительное влияние температуры и колебаний в концентрации энзима.

Построение стандартной кривой можно заменить вычислением количества сахара в крови по следующей формуле:

$$C_{кр} = E_{кр} = \frac{\sum \frac{C_c}{E_c}}{n},$$

где $C_{кр}$ — концентрация сахара в крови, *мг%*, $C_с$ — концентрация сахара в стандарте, *мг%*, $E_{кр}$ — оптическая плотность крови, $E_с$ — оптическая плотность стандарта, n — число взятых стандартов.

Нормативы. Определение глюкозы крови у 8 доноров энзиматическим методом дало в среднем 67 *мг%*, с пределами колебаний от 56 до 94 *мг%*. Пределы колебаний глюкозы в крови здорового человека по Миддлтону и Гриффитсу [12] составляют 50—90 *мг%*, по данным Маркса [12] средняя величина глюкозы крови здорового человека равна 80,6 *мг%*.

Выражение уровня сахара крови в *мг%* «истинной» глюкозы дает более правильное представление о динамике углеводного обмена, чем получаемые в клинике данные о редуцирующих веществах крови, определенных методом Хагедорна-Йенсена. Особую ценность глюкозооксидазный метод приобретает при диагностике

и контроле за ходом лечения целого ряда заболеваний, связанных с нарушениями углеводного обмена (диабет и др.). В период заболевания и в процессе лечения в крови возможно повышение различных редуцирующих веществ (даже не углеводной природы), что будет ошибочно регистрироваться методом Хагедорна-Йенсена как увеличение сахара. Аналогичное увеличение редуцирующих веществ в крови и моче может наблюдаться при употреблении некоторых антибиотиков (например, тетрациклина).

Упрощенный микрометод определения глюкозы в крови [13]

П р и н ц и п. При ферментативном определении глюкозы с глюкозооксидазой [1] и пероксидазой [2] происходят следующие реакции:

$$1)\quad \text{глюкоза} + H_2O + O_2 \xrightarrow{\text{глюкозооксидаза}} H_2O_2 + \text{глюконовая кислота};$$

$$2)\quad H_2O_2 + DH_2 \xrightarrow{\text{пероксидаза}} 2H_2O + D.$$

Сперва глюкоза окисляется глюкозооксидазой, при этом и образуются глюконовая кислота и перекись водорода. В присутствии донатора водорода (DOH_2) и перекиси водорода сперва образуется бесцветный хромоген (DH_2), например дианизидингидрохлорид, который переходит в окрашенное вещество. Посредством подкисления вызывается максимальная интенсивность окраски индикатора, прямо пропорциональная количеству окисляемой глюкозы.

Детали анализа см. [13]. Относительно автоматических ферментативных методов определения глюкозы см. [14].

Определение *D*-фруктозы [3] [15]

П р и н ц и п. Гексозы (глюкоза, фруктоза и манноза) переводятся действием АТФ с гексокиназой (ГК) в соответствующие гексозо-6-фосфаты:

$$\text{гексоза} + \text{АТФ} \overset{\text{гексокиназа}^{4}}{\rightleftarrows} \text{гексозо-6-фосфат} + \text{АДФ}. \qquad (1)$$

Из числа образовавшихся гексозо-6-фосфатов действием глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (Г-6-Ф-ДГ) [5] и НАДФ в первую очередь превращают глюкозо-6-фосфат (Г-6-Ф) в 6-фосфоглюконат и НАДФ-H_2:

$$\text{глюкозо-6-фосфат} + \text{НАДФ} \rightleftarrows \text{6-фосфоглюконат} + \text{НАДФ-Н} + H^+. \qquad (2)$$

---

1 КФ 1.1.3.4.
2 КФ 1.11.1.7.
3 Метод можно использовать и для анализа растительного материала.
4 КФ 2.7.1.1.
5 КФ 1.1.1.49.

После завершения этой реакции определяют содержание фруктозо-6-фосфата (Ф-6-Ф); смесь содержит Ф-6-Ф пробы, а также Ф-6-Ф, который по уравнению (1) образовался из фруктозы. Добавлением фосфоглюкозоизомеразы ФГИ (см. ниже) Ф-6-Ф переводят в Г-6-Ф:

$$\text{фруктозо-6-фосфат} \rightleftarrows \text{глюкозо-6-фосфат}, \tag{3}$$

который вновь определяют соответственно уравнению (2). Измеряют увеличение экстинкции НАДФ-H_2 при 366 или 340 *ммк*. Равновесия реакций (1) и (2) лежат далеко на правой стороне. Равновесие реакции (3) не имеет значения, так как Г-6-Ф немедленно реагирует дальше. Все три реакции протекают стехиометрически.

Реактивы (чтобы задержать рост микроорганизмов, пропаривают все сосуды): 1) триэтаноламиновый буферный раствор (0,05 *М*, pH 7,6): 9,3 *г* триэтаноламингидрохлорида растворяют в 22 *мл* 1 н. раствора NaOH, доливают бидистиллированной водой до 1000 *мл*, контролируют значение pH (стеклянный электрод); 2) хлорид магния (0,1 *М* раствор): 2,03 *г* $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ растворяют в бидистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*; 3) раствор аденозинтрифосфата (около 0,017 *М* АТФ): 10 *мг* АТФ-$Na_2H_2 \cdot 3H_2O$ растворяют в 1 *мл* бидистиллированной воды; 4) никотинамидадениндинуклеотидфосфат (около 0,012 *М* раствор НАДФ): 10 *мг* НАДФ-NaH_2 растворяют в 1 *мл* бидистиллированной воды; 5) гексокиназа (1 *мг* белка на 1 *мл*): основную взвесь соответственно разводят 3,2 *М* раствором сульфата аммония; 6) глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа — Г-6-Ф-ДГ[1] (взвесь 1 *мг* белка на 1 *мл*); 7) фосфоглюкозоизомераза — ФГИ (взвесь 1 *мг* белка на 1 *мл*).

Все растворы и суспензии хранят закупоренными в холодильнике при 0—4°. Так они сохраняются по крайней мере несколько недель.

Техника. *Подготовка исследуемого материала.* Биологический материал, например, кровь, гомогенаты ткани, экстракты растений должны быть до определения очищены от белков. Растворимый исходный материал (не содержащий белков) после растворения в бидистиллированной воде доводят до подходящего объема и применяют (например, при анализе меда или искусственного меда) в виде 0,2%-ного раствора. Частично растворимый материал (молочный порошок или порошок мороженого крема) взбалтывают около 10 мин. с бидистиллированной водой. Нерастворимый материал отфильтровывают, фильтр промывают бидистиллированной водой и фильтрат доводят до соответствующего объема.

Постановка опыта. Измерение ведут при длине волны 366 или 340 *ммк*; толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 3,0 *мл*, температура комнатная; измерение ведут против контрольной пробы. Отмеривают в кювету пипеткой последовательно: для контрольного опыта — 2,88 *мл* буферного раствора (1), 0,02 *мл* пробы; для

[1] КФ1.1.1.49.

главного опыта — 2,65 *мл* буферного раствора (1), 0,10 *мл* раствора (2), 0,10 *мл* раствора АТФ (3), 0,10 *мл* раствора НАДФ (4), 0,02 *мл* пробы, 0,01 *мл* суспензии ГК (5); хорошо смешивают стеклянной или пластмассовой палочкой с плоским нижним концом и отсчитывают экстинкцию (E_1). Добавляют 0,1 *мл* суспензии Г-6-Ф-ДГ (6), экстинкцию отсчитывают через 10, 12, 14, 16 мин. и экстраполируют на время добавления Г-6-Ф-ДГ (E_2). Примешивают 0,01 *мл* суспензии ФГИ (7) и ожидают конца реакции; отсчитывают экстинкцию E_3. Получают:

$$E_3 - E_1 = \Delta E_{\text{глюкоза} + \text{фруктоза} + \text{Г-6-Ф} + \text{Ф-6-Ф}};$$

$$E_2 - E_1 = \Delta E_{\text{глюкоза} + \text{Ф-6-Ф}};$$

$$E_3 - E_2 = \Delta E_{\text{фруктоза} + \text{Ф-6-Ф}}.$$

Даже высокоочищенные препараты ГК[1] и Г-6-Ф-ДГ[2] содержат следы ФГИ. Поэтому уже до прибавления ФГИ к системе опыта начинается медленное превращение Ф-6-Ф; E_2 должно быть точно определено посредством экстраполяции (значения E_2, не определенные экстраполяцией, приводят к ложным результатам). Если проба содержит фруктозо-6-фосфат (и глюкозо-6-фосфат), то загружают вторую кювету бидистиллированной водой вместо гексокиназы и измеряют, как было описано. При этом значения измерений обозначают E'_1, E'_2 и E'_3. Тогда

$$E'_3 - E'_1 = \Delta E_{\text{г-6-ф} + \text{Ф-6-Ф}};$$

$$E'_2 - E'_1 = \Delta E_{\text{г-6-Ф}};$$

$$E'_3 - E'_2 = \Delta E_{\text{ф-6-ф}}.$$

$\Delta E_{\text{фруктоза} + \text{Ф-6-Ф}} - \Delta E_{\text{ф-6-ф}} = \Delta E_{\text{фруктозы}}$; это значение включают в вычисление.

Вычисление. Для содержимого 3-миллилитровой кюветы: при 340 *ммк* $\frac{\Delta E_{\text{фруктозы}} \cdot 3{,}0}{6{,}22}$ *мкмолей* фруктозы (опыт); при 366 *ммк* $\frac{\Delta E_{\text{фруктозы}} \cdot 3{,}0}{3{,}3}$ *мкмолей* фруктозы (опыт).

Соответствующие формулы пригодны для вычисления глюкозы, Г-6-Ф и Ф-6-Ф. Для пересчета микромолей в *мкг* умножают полученную величину на молекулярный вес (мол. вес. фруктозы — 180,2).

Чтобы определить содержание фруктозы в исследуемом веществе, надо учитывать навеску и разведение.

Пример. 0,2 *г* искусственного меда было растворено в бидистиллированной воде, после чего объем был доведен до 100 *мл* и для опыта взято 0,02 *мл*. Измеряли при 360 *ммк*: $E_1 = 0{,}020$, $E_2 = 0{,}124$,

[1] КФ 2.7.1.1.
[2] КФ 1.1.1.49.

E_3 = 0,220. Проба была свободна от Г-6-Ф и Ф-6-Ф. Таким образом, $\Delta E_{\text{глюкоза + фруктоза}} = 0,200$, $\Delta E_{\text{глюкозы}} = 0,104$ и $\Delta E_{\text{фруктозы}} = 0,096$. Следовательно, 100 *мл* исследуемого раствора (0,2 *г* искусственного меда) содержали:

$$\frac{0,096 \cdot 3,0 \cdot 100 \cdot 180,2}{3,3 \cdot 0,02} = 78,700 \text{ мкг фруктозы}$$

и, по соответствующему вычислению, 85 200 *мкг* глюкозы.

Источники ошибок. Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа [1] и фосфоглюкозоизомераза специфичны для Г-6-Ф или Ф-6-Ф. Таким образом, фосфорилированная, согласно реакции (1), манноза не реагирует более в реакциях (2) и (3).

Недостаточная очищенность применяемых реактивов, особенно ферментов, приводит к ложным значениям. Если, например, один из ферментов содержит слишком много 6-фосфоглюконат — дегидрогеназы [2], то находят слишком много фруктозы. Если один из ферментов содержит слишком много оксидазы НАДФ-H_2, то находят слишком мало фруктозы. Другие, даже фосфорилированные сахара не мешают реакции. Точность метода около 3%.

Определение лактозы [16]

Принцип. β-галактозидаза [3] катализирует гидролиз лактозы:

$$\text{лактоза} + H_2O \rightarrow \text{галактоза} + \text{глюкоза}. \quad (1)$$

В присутствии гексокиназы и аденозинтрифосфата (АТФ) глюкоза фосфорилируется:

$$\text{глюкоза} + \text{АТФ} \rightarrow \text{глюкозо-6-фосфат} + \text{АДФ}. \quad (2)$$

В качестве индикаторной реакции служит окисление глюкозо-6-фосфата никотинамидадениндинуклеотидфосфатом (НАДФ) в присутствии глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы) (см. стр. 161):

$$\text{глюкозо-6-фосфат} + \text{НАДФ}^+ \rightarrow \text{6-фосфоглюконат} + \text{НАДФ-Н} + H^+. \quad (3)$$

НАДФ-H_2 определяют по поглощению света при длине волны 340 *ммк*. В сильно разведенных растворах трансглюкозидирующая активность β-галактозидазы (см. стр. 161) не имеет значения. В описанном ниже методе концентрации выбирают таким образом, чтобы реакция (1) обусловила скорость процесса, и образовавшаяся глюкоза исчезала после реакций (2) и (3).

Реактивы: 1) солевой раствор (около 1 *М* хлорида магния, 1 *М* хлорида калия): 20 *г* $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ и 7,5 *г* хлористого калия растворяют в воде и объем доводят до 100 *мл*; 2) трис-ацетатный буфер-

[1] КФ 1.1.1.49.
[2] КФ 4.2.1.12.
[3] КФ КФ 3.2.1.23.

ный раствор (0,05 *М*, pH 8,0): 0,1 *М* раствор уксусной кислоты (5,75 *мл* ледяной уксусной кислоты разводят водой, освобожденной током азота от O_2 до 1000 *мл*), титруют 1 *М* трис-буферным раствором (12 *г* трис-оксиметиламинометана в 100 *мл* раствора) до pH 8 (стеклянный электрод) и разводят водой до увеличения первоначального объема вдвое, чтобы раствор был 0,05 *М* в отношении ацетата; через раствор пропускают азот для удаления воздуха и сохраняют под азотом; 3) раствор аденозинтрифосфата (около 0,5*М* АТФ): 50 *мг* АТФ - $Na_2H_2 \cdot 3H_2O$ растворяют в 1 *мл* воды; 4) никотинамидадениндинуклеотидфосфат (около 0,025 *М* раствор НАДФ): 20 *мг* НАДФ-NaH_2 растворяют в 1 *мл* воды; 5) гексокиназа (около 10 *мг* белка в 1 *мл*): 50 *мг* сухого порошка суспендируют в 5 *мл* воды; взвесь соответственно разводят 3 *М* раствором сульфата аммония; 6) глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа Г-6-Ф-ДГ (около 2 *мг* белка в 1 *мл*): основную взвесь соответственно разводят 3,3 *М* раствором сульфата аммония; 7) β-галактозидаза — около 30 *мг* белка в 1 *мл*: фермент растворяют или разводят раствором 2; 8) глюкоза (0,02 *М* раствор): 360 *мг* глюкозы растворяют в воде и объем раствора доводят до 100 *мл*; сохраняют в полиэтиленовых (не стеклянных) бутылях в замороженном виде. Растворы 1—8 можно, как будет описано дальше, применять каждый в отдельности. Реактивы, необходимые для определения глюкозы, могут быть соединены в растворе 9; для этого к 18,0 *мл* буферного раствора (раствор 2) добавляют 0,2 *мл* солевого раствора (1), 0,4 *мл* взвеси глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (6), 0,4 *мл* раствора НАДФ (4), 0,4 *мл* раствора гексокиназы (5) и 0,2 *мл* раствора АТФ (3); этой смеси достаточно примерно для 20 анализов; 10) лактоза (0,02 *М* раствор): 680 *мг* лактозы растворяют в воде и объем дополняют до 100 *мл*; сохраняют в полиэтиленовых бутылях в замороженном виде.

Все реактивы, кроме раствора 1, сохраняют предпочтительно в полиэтиленовых бутылях. При употреблении оставляют стоять на льду. В этих условиях все растворы, включая 9, не портятся в течение нескольких недель.

Техника. *Подготовка исследуемого материала.* Большие количества глюкозы в исследуемом материале мешают определению, небольшие количества дают лишь высокие значения слепого опыта. В ряде случаев рекомендуется предварительно удалить моносахариды путем адсорбции на колонке с активным углем с последующим отмыванием их водой. Лактозу и другие полисахариды можно удалить элюированием разведенным алкоголем. Этим способом могут быть удалены моносахариды, соли и реактивы, осаждающие белки, но иногда бывает необходимо промывать уголь большим количеством воды.

Постановка опыта. Для определения глюкозы в кварцевую кювету (емкость 1 *мл*, толщина слоя 1 *см*) отмеривают пипеткой 0,980 *мл* раствора 9 или 0,9 *мл* буферного раствора (2), 10 *мкл* солевого раствора (1), 20 *мкл* раствора глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (6), 20 *мкл* раствора НАДФ (4), 20 *мкл* раствора гексокиназы (5),

10 *мкл* раствора АТФ (3), оставляют нагреваться до комнатной температуры, хорошо смешивают маленькой полиэтиленовой (не стеклянной) палочкой и устанавливают спектрофотометр при длине волны 340 *ммк* на нулевую экстинкцию.

Если экстинкция в течение нескольких минут не изменяется, то добавляют 5 *мкл* раствора глюкозы (8), т. е. 0,1 *мкмоля* глюкозы. Для этого применяют микропипетку Ланга — Леви, верхний конец которой снабжен резиновой трубкой. Кончик пипетки доводят почти до дна кюветы, содержимое ее выдувают. Экстинкция при 340 *ммк* должна тотчас повыситься и за 10—15 мин. достигнуть конечного значения около 0,620, если реактивы для определения глюкозы приготовлены точно. Для определения лактозы таким же образом отмеривают пипеткой в кварцевую кювету 0,980 *мл* раствора 9 или растворы 1—4 в приведенных выше количествах и последовательности. Сюда же добавляют: 5 *мкл* раствора лактозы (10) (0,1 *мкмоля* лактозы), 20 *мкл* β-галактозидазы(7). 0,980 *мл* растворов 9 или 1—6 в приведенных выше количествах и последовательности отмеряют пипеткой в кварцевую кювету (емкость 1 *мл*, толщина слоя 1 *см*). Сюда же добавляют 5 *мкл* исследуемого материала, который содержит часто некоторое количество примеси глюкозы. Ждут, пока экстинкция не достигнет постоянного значения E_1 при 340 *ммк*. К содержимому кюветы добавляют 20 *мкл* раствора β-галактозидазы (7), размешивают и после окончания реакции измеряют экстинкцию E_2 при длине волны 340 *ммк*. Изменение экстинкции ($\Delta E = E_2 - E_1$) служит для вычисления.

Вычисление. 1 *мкмоль* лактозы дает 1 *мкмоль* НАДФ-Н (см. «Принцип»). Для взятого здесь объема пробы в 1,005 *мл* и для толщины слоя кюветы в 1 *см*:

$$\frac{\Delta E \cdot 1{,}005 \cdot 340}{10^{-6} \cdot 6{,}22 \cdot 10^{-6} \cdot 1 \cdot 0{,}005} = \Delta E \cdot 11 \cdot 10^3 = \text{мкг лактозы}$$

в 1 *мл* пробы $= \Delta E \cdot 11 =$ *мг* лактозы в 1 *мл* пробы[1].

Если толщина слоя (d) кюветы или объем пробы (v) отклоняются от данных значений, то это следует учитывать при вычислении.

Пример. Пробой служил элюат (50%-ный этанол) с активированного угля. Его выпаривали до консистенции сиропа или до сухого состояния, снова растворяли в воде до 10 *мл* и отфильтровывали. 5 *мкл* были взяты для анализа: $v = 1{,}05$ *мл*; $d = 0{,}970$ *см*, $\Delta E = 0{,}886$. Таким образом:

$$\Delta E \cdot \frac{11}{0{,}970} = 0{,}886 \cdot \frac{11}{0{,}970} = 10{,}05 \text{ мг лактозы в 1 мл пробы,}$$

или 100,5 *мг* лактозы в 10 *мл* исследуемого материала.

---

[1] Согласно уравнению: $C = \frac{\Delta E \cdot V \cdot \text{Мв}}{10^{-6} \cdot E \cdot d \cdot v}$, где C — концентрация в *мкг/мл*, v — объем раствора в кювете в *мл*, Мв — мол. вес, d — толщина слоя в кювете в *см*, v — объем взятой пробы в *мл*, E — экстинкция ($= 6{,}22 \cdot 10^{-6}$ *см²/моль*).

Источники ошибок. Другие олигосахариды, в которых глюкоза соединена с галактозой β-глюкозидной связью, участвуют в реакции, однако такие соединения обычно встречаются в очень малых количествах. Если подозревают их присутствие в пробе, то оно может быть проверено бумажной хроматографией. Их можно отделить хроматографически на угольной колонке. Другие сахара, как галактозил-β-1-6-глюкоза, можно отделить бумажной хроматографией. Точность метода после хроматографирования 3%. Относительно нового метода определения лактозы см. [27].

Определение дисахаридов [17]

Принцип. Метод разработан применительно к определению дисахаридов в содержимом кишечника. Применяемая для анализа глюкозооксидаза [1] обладает ничтожной сахарозной активностью, что позволяет воспроизвести следующие четыре последовательные реакции в отсутствие триса:

1) дисахарид $+ H_2O \xrightarrow{\text{дисахаридаза}}$ глюкоза ($+$ прочие моносахариды);

2) α-глюкоза $\underset{}{\overset{\text{фосфат}}{\rightleftarrows}}$ β-глюкоза;

3) β-глюкоза-$O_2 \xrightarrow{\text{глюкозооксидаза}}$ глюконолактон $+ H_2O_2$;

4) $H_2O_2 +$ *о*-дианизидин $\xrightarrow{\text{пероксидаза}} H_2O +$ окисленный *о*-дианизидин (коричневый)

Оптическая плотность окрашенного раствора при 530 *ммк* пропорциональна количеству окисленной глюкозы, а следовательно, активности дисахаридазы.

Реактивы: 1) субстраты; продажные препараты дисахаридов, за исключением сахарозы и лактозы, обычно нуждаются в предварительной очистке от следов глюкозы, что производят следующим образом: 4 *г* дисахарида, 2 *мг* каталазы [2] и 2 *мг* глюкозооксидазы [3] растворяют в 100 *мл* воды, добавляют 2 капли толуола и оставляют стоять в открытой колбе при комнатной температуре в течение 18 час., время от времени перемешивая. К концу этого времени вследствие образования глюконовой кислоты кислотность растворов повышается: мальтозы до pH 3,3, трегалозы — pH 4,1 и целлобиозы — pH 4,4. Растворы трижды фильтруют через слой ДЭАЭ-целлюлозы с отсасыванием. Бикарбонатную форму ДЭАЭ-целлюлозы, применяемую в данном случае, приготовляют, растирая 5 *г* адсорбента в 200 *мл* 0,2 *М* раствора бикарбоната натрия в течение 30 мин., суспензию промывают на воронке Бюхнера водой до исчезновения

[1] КФ 1.1.3.4.
[2] КФ 1.11.1.6.
[3] КФ 1.1.3.4.

в промывных водах следов щелочи. После фильтрации растворы дисахаридов имеют pH 7. Растворы субстратов, освобожденные от следов глюкозы, сохраняют при температуре —20 , концентрация дисахаридов в них, определяемая антроновым методом, составляет около 0,11 *М*; 0,062 *М* растворы сахарозы, лактозы, трегалозы и целлобиозы и 0,031 *М* раствор мальтозы приготовляют разбавлением водой исходных растворов указанных дисахаридов, не содержащих глюкозы; 2) фосфатный раствор глюкозооксидазы: 1 или 2 *мг* препарата глюкозооксидазы (в зависимости от его растворимости в воде) растворяют в следующей смеси: 9,8 *мл* фосфатного буфера (0,5 *М*, pH 6), 1 *мл* 1%-ного раствора *о*-дианизидина в 95%-ном этаноле и 0,1 *мл* 0,1%-ного раствора пероксидазы. Предварительно определяют активность глюкозооксидазы следующим способом: 0,05—1,0 *мкг* препарата растворяют в 0,25 *М* натрий-фосфатном буфере, pH 6. 1 *мл* указанного раствора смешивают с 1 *мл* раствора, содержащего 0,04 *М* глюкозы, 0,1% *о*-дианизидина, 0,01 % пероксидазы [1] в 0,26 *М* фосфатном буфере с pH 6. Смесь инкубируют при 37° в течение 15 или 30 мин.; затем, для остановки реакции, добавляют 1 *мл* 50%-ной серной кислоты; оптическую плотность развивающейся пурпурной окраски измеряют при 530 *ммк* против контроля, не содержащего глюкозооксидазы [2]. Активность глюкозооксидазы выражают в *мкмолях* глюкозы, окисленных в течение 1 мин. при 37° и pH 6. Активность примененных препаратов глюкозооксидазы составляла от 10 600 до 35 500 ед.; 3) стандартный раствор глюкозы: 200 *мг* глюкозы и 2,7 *г* бензойной кислоты растворяют в воде, доводя объем до 1000 *мл*; этот раствор содержит 200 *мкг/мл* глюкозы, стоек при комнатной температуре; 4) 50%-ный раствор серной кислоты.

Техника. *Исследуемый материал*. 20%-ный гомогенат слизистой тонкой кишки (исходя из влажного веса ткани) готовят методом, описанным ранее [5]. Степень разбавления исходного гомогената, наивысшая при определении мальтозы, понижается в следующем порядке: изомальтоза [3], сахароза [4], трегалоза [5], лактоза [6] и целлобиоза [7]. Гомогенат сохраняют при —20 °, многократное оттаивание и замораживание не изменяет его активности.

Постановка опыта. 100 *мкл* фосфатного раствора глюкозооксидазы смешивают с 20 *мкл* разбавленного гомогената кишечной слизистой в пробирках размером 0,7 × 8 *см*. Пробирки помещают в водяную баню при 37° на 1—2 мин. и затем добавляют 100 *мкл* раствора субстрата (дисахарида). Смесь инкубируют в течение 75 мин. и затем останавливают реакцию добавлением 100 *мкл* 50%-ной серной кислоты. Следующую пробирку инкубируют в тече-

[1] КФ 1.111.7.
[2] КФ 1.1.3.4.
[3] КФ см. мальтоза 3.2.1.20.
[4] КФ 3.2.1.26.
[5] КФ 3.2.1.28.
[6] КФ 3.2.1.23.
[7] КФ 3.2.1.21.

ние лишь 15 мин. и останавливают ферментативную реакцию таким же способом. Оптическую плотность растворов, окрашенных в пурпурный цвет, определяют на спектрофотометре при 530 *ммк* против контроля, состоящего из 100 *мкл* фосфатного раствора глюкозооксидазы, 120 *мкл* воды и 100 *мкл* 50%-ной серной кислоты. Определение оптической плотности производят в микрокюветах объемом 0,1 *мл*, толщиной 6,4 *мл*. Растворы дисахаридов разбавляют таким образом, чтобы после 75-минутной инкубации оптическая плотность смеси не превышала 0,6.

Количество глюкозы, содержащееся в опытной и контрольной смеси, определяют по предварительно составленной калибровочной кривой. Для построения калибровочной кривой смешивают 100 *мкл* фосфатного раствора глюкозооксидазы с 10, 15 или 20 *мкл* стандартного раствора глюкозы (содержащего, соответственно, 2, 3 и 4 *мкг* глюкозы), доливают водой до объема 220 *мкл*. Смесь инкубируют около 15 мин. для полного окисления глюкозы, после чего добавляют 100 *мкл* 50%-ной серной кислоты и измеряют оптическую плотность при 530 *ммк* против слепой пробы, не содержащей глюкозы.

Активность кишечных дисахаридаз выражают в *мкмолях* дисахаридов, гидролизованных 1 *мл* исследуемого материала за 1 мин.; расчет можно произвести, пользуясь формулой

$$\frac{(G_{75} - G_{15})\, d \times 50}{n \times 60 \times 180} \quad \text{или} \quad \frac{(G_{75} - G_{15}) \cdot d}{n \times 216},$$

где G_{75} и G_{15} — количество глюкозы в *мкг*, найденное после 75- и 15-минутного гидролиза, d — фактор разведения раствора дисахарида, n — число молекул глюкозы, отщепляемых от мальтозы молекулой субстрата (для сахарозы и лактозы $n = 1$, изомальтозы, трегалозы и целлобиозы $n = 2$).

Источники ошибок. При определении изомальтазной активности необходимо одновременно с основным определением провести слепой опыт со смесью, не содержащей дисахаридазы, поскольку препараты глюкозооксидазы обычно медленно реагируют с изомальтазой. Ингибирующее действие на дисахаридазную активность может оказать гомогенат ткани, если содержание в нем слизистой достигает 2,5%. Данных о проверке метода другими лабораториями не имеется.

Определение гликогена [18]

Принцип. Гликоген подвергают гидролизу и образующуюся при этом глюкозу фосфорилируют действием АТФ, в результате чего образуются стехиометрические количества АДФ. АДФ превращается во вспомогательной реакции с ФЕП (фосфоенолпировиноградной кислотой) в АТФ и пируват, который определяется по убыли экстинкции НАД-Н. Все реакции протекают количественно слева направо.

Реактивы (все реактивы изготовляют на бидистиллированной воде): 1) трихлоруксусная кислота (20%-ный раствор): 20 *г* трихлоруксусной кислоты растворяют в H_2O и доводят объем до 100 *мл*; 2) триэтаноламиновый буферный раствор (0,1 *М*, pH 7,6): 18,6 *г* триэтаноламингидрохлорида растворяют в 800 *мл* H_2O, доводят pH до 7,6 добавлением около 22 *мл* 2 н. раствора едкого натра и доливают H_2O до 1000 *мл*; 3) ФЕП (фосфоенолпируват) — около $3 \cdot 10^{-2}$ *М* раствор ФЕП: 100 *мг* ФЕП (соль трициклогексиламмония) растворяют в 7 *мл* воды; 4) восстановленный дифосфопиридиннуклеотид (около $1,2 \cdot 10^{-2}$ *М* раствор НАД-H_2): 50 *мг* НАД-Н-Na_2 растворяют в 5 *мл* воды; 5) хлористый калий (2 *М* раствор): 14,9 *г* KCl растворяют в H_2O и доводят объем до 100 *мл*; 6) сульфат магния (0,5 *М* раствор): 12,3 *г* $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ растворяют в воде и доливают до 100 *мл*; 7) аденозинтрифосфат (около $3 \cdot 10^{-2}$ *М* раствор АТФ): 100 *мг* АТФ-$Na_2H_2 \cdot 3H_2O$ растворяют в 5 *мл* воды; 8) лактикодегидрогеназа — ЛДГ [1] (около 5 *мг* белка в 1 *мл*): суспензию препарата разбавляют 2,1 *М* раствором сульфата аммония; 9) пируваткиназа — ПК[2] (около 5 *мг* белка на 1 *мл*): суспензию препарата разводят соответственно 2,1 *М* раствором сульфата аммония; 10) гексокиназа — ГК[3] (2 *мг* белка в 1 *мл*): 10 *мг* сухого порошка растворяют в 5 *мл* буферного раствора (2). Суспензию высокоочищенной ГК соответственно разводят 3,0 *М* раствором сульфата аммония.

В замороженном состоянии растворы НАД-H_2, АТФ и ФЕП можно сохранять неограниченное время. Суспензии ферментов сохраняются при температуре от 0 до 4° несколько месяцев без потери активности.

Техника. *Подготовка исследуемого материала.* В центрифужной пробирке с калибровочной отметкой 10 *мл* смешивают 2 *мл* 30%-ного раствора едкого кали и 1 *мл* пробы (гомогенизированной ткани, экстрактов ткани или безбелковых растворов) и нагревают около 15 мин. в кипящей водяной бане; добавляют около 3,5 *мл* этанола, дают вскипеть и охлаждают при комнатной температуре. Осадок, содержащий гликоген, отцентрифуговывают, промывают 3 *мл* этанола. Этанол отгоняют на водяной бане, к осадку добавляют 2 *мл* 2 н. раствора серной кислоты (для гидролиза гликогена) и нагревают в течение 120 мин. в кипящей водяной бане. Гликоген гидролизуется в глюкозу. Охлаждают при комнатной температуре и нейтрализуют 2 н. раствором едкого натра (до pH 5—7), доливают дистиллированной водой до 10 *мл* и берут 0,1 *мл* этого раствора для определения глюкозы. Берут кровь из кончика пальца натощак и тотчас производят осаждение белков. Отмеривают пипеткой 0,8 *мл* воды и 0,1 *мл* крови в центрифужную пробирку и хорошо смешивают; затем добавляют 0,1 *мл* раствора трихлоруксусной кислоты (1) и центрифугируют несколько минут. Надосадочную

[1] КФ 1.1.1.27.
[2] КФ 2.7.1.40.
[3] КФ 2.7.1.1

жидкость применяют непосредственно для измерения. Избыток кислоты нейтрализуется буферным раствором.

Последовательно отмеривают пипеткой в кювету: 2,53 *мл* буферного раствора (2), 0,04 *мл* ФЕП (3), 0,06 *мл* НАД-H_2 (4), 0,10 *мл* раствора KCl (5), 0,10 *мл* раствора $MgSO_4$ (6), 0,10 *мл* АТФ (7), 0,01 *мл* суспензии ЛДГ (8), 0,01 *мл* суспензии ПК (9), 0,05 *мл* суспензии ГК (10).

Затем оставляют стоять 5 мин. Реагируют АДФ и пируват, которые могут содержаться в растворах в качестве загрязнений. Измерение на спектрофотометре ведут при длине волны 340 или 366 *ммк*. Толщина слоя 1 *см*. Объем анализируемой жидкости 3,10 *мл*. Температура комнатная. Определяют экстинкцию E_1. Добавляют 0,10 *мл* раствора пробы и начинают определение глюкозы. Реакция заканчивается приблизительно за 10 мин. Производят отсчет экстинкции E_2. Дальнейшую незначительную убыль экстинкции элиминируют посредством графической экстраполяции ко времени начала реакции («нулевое» время).

Степень разведения, вызванного прибавлением 0,10 *мл* пробы, вычисляют по формуле

$$E_{1\ \text{испр.}} = E_1 \frac{3,0}{3,1} = 0,97\ E_1$$

и учитывают при вычислении результатов анализа

$$\Delta E = E_{1\ \text{испр.}} - E_2.$$

Таким образом:

$$\frac{\Delta E \cdot 180}{6,22 \cdot 10^3} = \text{мг глюкозы в 1 мл опыта},$$

где 180 — мол. вес. глюкозы, $6,22 \cdot 10^3$ — коэффициент экстинкции НАД-H_2 (*см²/мкмоль*) при 340 *ммк*. Для 366 *ммк* коэффициент экстинкции НАД-H_2 составляет $3,3 \cdot 10^3$.

При умножении результата на 3,10 получают количество глюкозы в 0,10 *мл* пробы. Для перечисления в миллиграмм-проценты глюкозы полученный результат умножают на фактор разведения, вызванного осаждением белков (10 : 1) и результат относят к 100 *мл* крови; таким образом:

$$\frac{\Delta E \cdot 180 \cdot 3,1}{6,22 \cdot 10^3} \cdot \frac{10}{1} \cdot 1000 = \frac{\Delta E \cdot 10 \cdot 558}{6,22} = \text{мг \% глюкозы в крови.}$$

И с т о ч н и к и   о ш и б о к. Гексокиназа[1] фосфорилирует наряду с глюкозой в присутствии АТФ также фруктозу, глюкозамин и маннозу. Так как эти соединения, как правило, встречаются либо в связанном состоянии, либо в очень незначительных концентрациях (фруктоза до 4 *мг%*), то определению глюкозы они практически не

[1] КФ 2.7.1.1.

мешают. Специфичность при определении гликогена достаточна, так как гликоген перед этим очищается осаждением его алкоголем (отделяется от низкомолекулярных соединений).

Если экстракты ткани содержат много АДФ, то получаются слишком высокие значения глюкозы. В таких случаях меняют порядок прибавления раствора пробы и гексокиназы к реактиву, для того чтобы АДФ могла бы прореагировать до начала подлинного определения. Тогда начинают реакцию с чистой гексокиназой (свободной от миокиназы) [1]. Точность метода около 5%.

Буэдинг и Гавкинс [19] разработали метод ферментативного расщепления гликогена и его микроопределения. Метод основан на определении глюкозо-1-фосфата (Г-1-Ф) и глюкозы, образующихся при полном расщеплении гликогена. Он требует 15—40 *мг* ткани с содержанием полисахарида гликогена 0,01—1,2 *мг* на 1 *г* сырого веса ткани. Содержание гликогена вычисляют по сумме Г-1-Ф и глюкозы, а отношение глюкозы к Г-1-Ф дает указание относительно количества точек ветвления со связью 1,6 и средней длины внешних цепей глюкозных остатков, связанных 1,4-связью. Полное расщепление гликогена достигается инкубацией навески ткани (или гликогена) в общем объеме 0,3 *мл*, содержащем 0,3 *мкмоля* АМФ, 0,03 *мл* фосфорилазы [1] «б», 20 ед. очищенной амило-1,6-глюкозидазы [2] и 200 *мкмолей* *К*-фосфатного буфера (pH 7,0) в течение 3 часов при 30°.

Для расщепления одной фосфорилазой навеску инкубируют 2 часа при 30° в общем объеме 0,26 *мл*, содержащем 0,3 *мкмолей* АМФ, 0,1 *мл* фосфорилазы «б» и 200 *мкмолей* К-фосфатного буфера (pH 7,0); в конце инкубации добавляют еще 0,04 *мл* фосфорилазы, продолжив инкубацию на 2 часа. Затем пробы помещают на лед, добавляют 2 н. раствор соляной кислоты до pH 2,5, 0,2 *М* имидазоловый буфер с pH 7,4, содержащий 0,005 *М* хлористого магния и центрифугируют при 13 000 *g* 30 мин. Г-1-Ф определяют спектрофотометрически в общем объеме 0,9 *мл* в присутствии 0,2 *мкмолей* НАДФ, 100 *мкмолей* имидазолового буфера pH 7,4, 1 *мкмоля* хлористого магния и 0,125 *мкмоля* магний-фруктозо-1,6-дифосфата; после регистрации оптической плотности при 340 *ммк* добавляют по 0,02 *мл* растворов фосфоглюкомутазы [3] и дегидразы Г-6-фосфата и вновь отмечают оптическую плотность; вычисление количества Г-1-фосфата производят, исходя из коэффициента молярной экстинкции НАДФ-H_2 и разницы между оптической плотностью до и после прибавления ферментов (на 1 *моль* Г-1-фосфата восстанавливается 1 *моль* НАДФ).

Свободную глюкозу, образующуюся при расщеплении гликогена, определяют в системе, содержащей гексокиназу [4], АТФ и дегидразу Г-6-фосфата [5]. Детали анализа см. [19].

---

[1] Фосфорилаза мышц; КФ 2.4.1.1.
[2] КФ 3.2.1.33.
[3] КФ 2.7.5.1.
[4] КФ 2.7.1.1.
[5] КФ 1.1.1.49.

В опытах по определению гликогена в гладких мышцах солитера морской свинки получено постоянное отношение глюкозо-1-фосфат: глюкоза, равное 11,5; эта величина дает возможность определять в расщепленных образцах только глюкозо-1-фосфат; умножив найденное количество *мкмолей* глюкозо-1-фосфата на фактор 1,087, получают общее количество глюкозных остатков в исследуемом гликогене. Данных относительно проверки метода другими лабораториями не имеется.

Определение гепарина [20]

Принцип. Гепарин ингибирует расщепление рибонуклеиновой кислоты и циклических пиримидиннуклеотидов рибонуклеазой [1]. Это ингибирование предположительно конкурентно; во всяком случае оно хорошо может быть выражено отношением:

$$\frac{V}{V_1} = 1 + K\,\frac{[I]}{K' + [S]}\,,$$

где V — скорость неингибированной ферментной реакции, $[S]$ — концентрация субстрата в *мкг/мл*, V_1 — скорость реакции, ингибированной гепарином, $[I]$ — концентрация ингибитора (гепарина) в *мкг/мл*, K' — константа Михаэлиса ингибированной реакции, K — константа Михаэлиса неингибированной реакции.

Реактивы (все реактивы изготовляют на бидистиллированной воде в кварцевой посуде): 1) ацетатный буферный раствор (0,2 *М*, pH 5,0): 70,5 объема 0,2 *М* раствора ацетата натрия (8,204 *г* уксуснокислого натрия в 500 *мл* воды) смешивают с 29,5 объема 0,2 *М* уксусной кислоты (11,5 *мл* ледяной уксусной кислоты о 1 *л* воды); 2) рибонуклеат натрия (0,2 %-ный раствор в/о): 0,2 *г* рибонуклеата натрия растворяют в 100 *мл* ацетатного буферного раствора; 3) рибонуклеаза, содержащая 50 *мкг* белка в 1 *мл*: а) 5 *мг* кристаллической панкреатической рибонуклеазы растворяют в 100 *мл* бидистиллированной воды; б) этот раствор разводят (непосредственно перед употреблением) бидистиллированной водой в соотношении 1 : 5; 4) стандартный раствор гепарина (10 *мкг/мл*, или 1 интерн. ед. в 1 *мл*): препарат гепарина (5000 интерн. ед. в 1 *мл*) разводят бидистиллированной водой 1 : 5000.

Все растворы сохраняют закупоренными в холодильнике при 2—4°. Раствор субстрата после добавления крупинки тимола сохраняется в холодильнике около 2 месяцев. Раствор рибонуклеазы (3, а) сохраняется также долго. Некоторая потеря активности не имеет значения, так как в каждой серии измерения проводится калибровка.

Техника. *Подготовка исследуемого материала.* Ввиду того что большие количества белка мешают определению и что для оценки результатов измерения необходима определенная концентрация

---

[1] КФ 2.7.7.16.

солей, гепарин следует отделить от этих веществ перед анализом. Удовлетворительного выхода гепарина из различных тканей можно добиться простым путем, однако при большом количестве мукополисахаридов отделение затруднено. Количественное выделение из сыворотки описанными до сих пор методами не удается. Из плазмы гепарин можно получить с хорошим выходом следующим путем: 1 *мл* оксалатной плазмы разводят 2 *мл* 0,05 *М* ацетатным буферным раствором (pH 5,9) и смешивают с 0,6 *мл* 0,4%-ного (в/о) раствора хлоргидрата аминоакридина. Основательно встряхивают и центрифугируют в течение 16 мин. при большом числе оборотов. Надосадочную жидкость отсасывают. Осадок (гепарин с примесью белка) растворяют в четырех каплях 0,2 н. раствора едкого натра, разводят 1 *мл* воды и несколько раз взбалтывают с эфиром. После отделения эфира водный щелочной раствор гепарина берут для анализа.

Постановка опыта (предварительное замечание). Так как измеряют скорость реакции, то раствор фермента очень точно отмеривают пипеткой. Рекомендуется работать в помещении с постоянной температурой. Растворы термостатируют при определенной температуре в водяной бане.

В каждой серии опытов производят по меньшей мере две калибровочные пробы и одну контрольную (свободную от гепарина). Рекомендуется многократно проводить контрольный опыт и брать средние цифры. При больших концентрациях ингибитора экстинкция вначале понижается несколько медленнее, чем в главной части кривой; эта более плоская часть кривой наблюдается при более низких концентрациях фермента и в отсутствие ингибитора.

Измерение ведут при длине волны 300 *ммк*; толщина слоя 1 *см* объем анализируемой жидкости 2,0 *мл*. Измерение против воды. В пробирки отмеривают пипеткой (в *мл*):

Раствор	Пробы опыта	Калибровочная проба	Контрольный опыт
Раствор пробы, содержащий от 1 до 5 *мкг* гепарина	0,1—1	—	—
Стандартный раствор гепарина (4)	—	0,1—0,5	—
Бидистиллированная вода	До 1	До 1	1
Раствор (3,б) рибонуклеазы	0,5	0,5	0,5
Раствор рибонуклеата натрия (2)	0,5	0,5	0,5

Встряхивают, тотчас разливают растворы по кюветам, каждую минуту измеряют экстинкцию, пока не наступит понижение ее в общей сложности на 0,060. Величины экстинкции (ордината) наносят против времени (абсцисса). Анализ становится более чувствительным и требует меньше времени, если имеется регистрирующий спектрофотометр, который дает возможность автоматически отмечать различия экстинкций. Это позволяет определить начальную скорость реакции.

Циклические пиримидиннуклеотиды не пригодны как субстраты для спектрофотометрического определения гепарина, так как изменение экстинкции, связанное с их расщеплением, слишком мало.

Вычисление. Из кривой «экстинкция — время» для калибровочной пробы берут время Δt_1, которое необходимо для падения экстинкции на $\Delta E = 0{,}040$; для контрольного опыта берут время Δt, которое необходимо для такой же величины падения экстинкции. Коэффициенты $\Delta t_1/\Delta t$ наносят против концентраций гепарина в калибровочном опыте (калибровочная кривая). Для каждой пробы также выводят коэффициент $\Delta t_1/\Delta t$ (Δt_1 — время для $\Delta E =$ $= 0{,}040$ в главном опыте; Δt — время для $\Delta E = 0{,}040$ в контрольном опыте) и отсчитывают соответствующую величину концентрации гепарина.

Источники ошибок. Многие сульфонированные макромолекулярные соединения ингибируют рибонуклеазу. Однако среди мукополисахаридов, полученных из биологического материала, только гепарин проявляет ингибирующие свойства.

Точность метода около 4%.

Определение лактулезы [29]

Принцип. Посредством электрофореза на силикагеле, с добавлением небольшого количества бисульфита, лактулезу выделяют из смеси тканевых углеводов. Соответствующие пятна экстрагируют 50%-ным метанолом, в экстракте определяют содержание лактулезы (5—100 *мкг*) посредством реакции с цистеином и карбазолом в присутствии серной кислоты.

Реактивы: 1) суспензия кремневой кислоты в 0,1 н. бисульфите натрия; 2) хроматографический растворитель: смесь *н*-пропанола с водой в отношении 85 : 15; 3) проявитель хроматограмм; 3%-ный раствор фенола в этаноле, содержащем 5% серной кислоты или димедон-фосфорного реактива; 4) 50%-ный метанол; 5) 1,5%-ный раствор солянокислого цистеина; 6) 70%-ная серная кислота; 7) 1,2%-ный раствор карбазола в 98%-ном этаноле; 8) набор углеводов, используемых в качестве «свидетелей».

Техника. *Хроматография.* Приготовляют тонкослойные пластинки геля кремневой кислоты, нанося суспензию силикагеля в 0,1 н. растворе бисульфита натрия на стеклянные пластинки размером 20 × 20 *см*. Толщина слоя силикагеля не должна превышать 250 *мк*. Для активирования пластинки помещают в сушильный шкаф на 1 час при 120°; до использования в опыте готовые пластинки хранят в эксикаторе над силикагелем. Водные растворы смеси исследуемых углеводов и «свидетелей» наносят на стартовую линию, отступая от края пластинки на 1,5 *см*.

Затем пластинки помещают в хроматографический сосуд размером 21 × 21 × 9 *см*, на дно которого налито 100 *мл* смеси растворителей. После достижения фронтом растворителя уровня ниже верхнего края сосуда на 3—4 *см*, на что требуется при комнатной

температуре 3—4 часа, пластинки достают и сушат при 110° в течение 10—15 мин. Локализацию пятен устанавливают, обрызгивая пластинки 3%-ным раствором фенола в этаноле, содержащем 5% серной кислоты (или димедонфосфорным реактивом) и нагревая их в течение 10 мин. при 120°.

Колориметрическое определение лактулезы. Расположение пятна искомого вещества определяют, сравнивая положение образовавшихся пятен с позицией «свидетелей». Пятно, местоположение которого соответствует местоположению пятна метчика (лактулезы), обводят карандашом, захватывая область шире видимого края на 1 *см*. Пятно соскабливают лезвием бритвы и количественно переносят в пробирку. В другую пробирку помещают силикачель свободного места пластинки, обработанной таким же способом, однако без нанесения углеводов. В обе пробирки (в опытную и контрольную) вливают по 3 *мл* 50%-ного метанола, пробирки встряхивают и оставляют стоять 30 мин. Элюат фильтруют и проводят с ним карбазол-цистеиновую реакцию. Для этого к элюату последовательно добавляют: 0,2 *мл* 1,5%-ного раствора солянокислого цистеина, 6 *мл* 70%-ной серной кислоты и 0,2 *мл* 1,2%-ного раствора карбазола в 98%-ном этаноле. Смесь инкубируют в течение 60 мин. при 37° и затем охлаждают водопроводной водой. Оптическую плотность растворов определяют спустя 10 мин. после охлаждения при 560 *ммк* против контроля на реактивы.

Источники ошибок. Метод позволяет определять количества лактулезы порядка 5—100 *мкг* в 1 *мл* элюата. Присутствие альдоз и кетоз не препятствует определению. Точность метода (по данным автора) около 5%.

Другие ферментные методы определения углеводов

Определение крахмала

Применение ферментных препаратов для количественного определения крахмала встречает значительные трудности (отсутствие соответствующих очищенных препаратов ферментов, наличие в исследуемом материале гликогена, трудно «отличаемого» ферментами, изменчивость соотношения между амилазой [1] и амилопектином в крахмалах различного происхождения и др.). Сравнительно воспроизводимые результаты дает метод при условии, что исследуемый материал не содержит гликогена [21].

Определение клетчатки

Методы определения клетчатки основаны на ее ферментативном разложении действием препарата целлюлозы [2]. Образовавшиеся растворимые углеводы отфильтровывают, остаток окисляют би-

[1] КФ α-амилаза — 3.2.1.1; β-амилаза — 3.2.1.2.
[2] КФ 3.2.1.4.

хроматом и серной кислотой и анализ заканчивают колориметрическим определением. Разность между результатами главного опыта и контрольного (без добавления препарата фермента) анализа позволяет вычислить количество клетчатки, гидролизованной ферментом. Метод позволяет определять 0,2—1,0 *мг* клетчатки с точностью до 3% [22].

Определение гемицеллюлоз

Метод основан на ферментативном разложении гемицеллюлоз, образующиеся при этом пентозы определяют колориметрическим путем [23].

Определение раффинозы

Метод основан на последовательном ферментативном гидролизе раффинозы. Сначала действием препарата инвертазы раффинозу разлагают на фруктозу и мелибиозу, которую затем действием мелибиазы расщепляют на глюкозу и галактозу. При этом происходят закономерные изменения угла вращения смеси и ее способности восстанавливать раствор Фелинга. Анализ можно закончить поляриметрическим определением или редуктометрическим титрованием [24].

Определение сахарозы

Метод основан на расщеплении сахарозы действием сахаразы [1]. Образующиеся при этом глюкозу и фруктозу переводят в глюкозо-6-фосфат, который определяют при помощи оптического теста по увеличению экстинкции НАД-H_2 [25].

Определение гликогена

Недавно предложена модификация метода определения гликогена при помощи амилоглюкозидазы [2] — см. [28].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ford J.* a. *Haworth* J. Clin. Chem., 1964, **10**, 1002.
2. *Frings F.* a. *Gery G.* Analyst, 1961, **76**, 287.
3. *Waldstein S.* et al. Clin. Chem., 1964, **10**, 381.
3a. *Hickman J.* a. *Ashwell G.* J. Biol. Chem., 1959, **234**, 758.
4. *Hickman J.* a. *Ashwell G.* J. Biol. Chem., 1959, **234**, 758.
5. *Holzer H.* a. *Goedde H.* Bioch. Bioph. Acta, 1960, **40**, 297.
6. *Burma D.* a. *Horecker B.* J. Biol. Chem., 1958, **231**, 1053.

[1] К.Ф. 3.2.1.26.
[2] КФ см. 3.2.1.20.

7. *Nordlie R.* a. *Fromm H.* J. Biol. Chem., 1959, **234**, 2523.
8. *Fromm H.* J. Biol. Chem., 1959, **234**, 3097.
9. *Stumpf P.* et al. J. Biol. Chem., 1958, **231**, 1031.
10. *Kaufman S.* J. Biol. Chem., 1955, **216**, 153.
11. *Bergmeyer H.* u. *Bernt E.* В кн. Bergmeyer H. см. [15], стр. 123.
12. *Городецкий В. К.* Методические письма, вып. 2, 1962. Ин-т. биол. мед. химии АМН СССР.
13. *Richterich R.* u. *Colombo* J. Klin. Wochenschr., 1962, N 23, 1208.
14. *Getchell. G.* et al. Clin. Chem., 1964, **10**, 540; *Thompson R.* Clin. Chim. Acta, 1966, **1**, 132; см. также *Robin M.* a. *Saifer A.* Clin. Chem., 1965, **9**, 840.
15. *Bergmeyer H.* Methoden der enzymatischen Analyse. Weinheim, 1962, S. 156.
16. *Julian G.* et al. J. Biol. Chem., 1961, **236**, 754.
17. *Messer M.* a. *Dahlquist A.* Anal. Chem., 1966, **14**, 376.
18. *Pfleiderer G.* u. *Grein L.* Bioch. Z., 1957, **328**, 499.
19. *Bueding E.* a. *Hawkins* J. Anal. Bioch., 1964, **10**, 26.
20. *Zöhlner N.* u. *Fellig* J. Amer. J. Physiol., 1953, **173**, 223.
21. *Whelan W.* В кн. Bergmeyer H. см. [15], стр. 63.
22. *Halliwell G.* Bioch., 1958, **68**, 605; 1961, **74**, 457.
23. *Howard B.* J. Bioch., 1957, **67**, 643.
24. *Whalley* (de) H. et al. Analyst, 1961, **76**, 287.
25. *Bergmeyer H.* См. [15], стр. 29.
26. *Barthelman W.* u. *Czok R.* Klin Wochenschr., 1962, N 11, 585.
27. *Heinz S.* u. *Stuhlfauth* K. Klin Wochenschr., 1965, N 14, 754.
28. *Abeles R.* et al. Anal. Bioch., 1966, **15**, 192.
29. *Adachi S.* Anal. Bioch., 1965, **12**, 137.
30. *Glaser L.* a. *Brown D.* J. Biol. Chem., 1955, **216**, 67.
31. *Cooper J. et al.* Arch. Bioch. Bioph., 1958, **74**, 306.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ

Определение муравьиной кислоты [1][1]

Принцип. Тетрагидрофолатформилаза катализирует образование N-10-формилтетрагидрофолиевой кислоты из тетрагидрофолиевой кислоты (ТГФ) и формиата в присутствии аденозинтрифосфата (АТФ). В кислой среде здесь образуется 5,10-метенилтетрагидрофолиевая кислота, которая обладает максимумом абсорбции при 350 *ммк*. В присутствии избытка ТГФ и АТФ реакция протекает полностью слева направо.

Реактивы: 1) триэтаноламиновый буферный раствор (1,0 *M*, pH 8,0): 149 *г* триэтаноламина растворяют в 750 *мл* воды, доводят pH концентрированной HCl до 8,0 и доливают дистиллированной водой до 1000 *мл*; 2) *DL*-тетрагидрофолиевая кислота (около 0,1 *M* раствор ТГФ, pH 7,0): 56 *мг* ацетата натрия растворяют в 10 *мл* 1 *M* раствора 2-меркаптоэтанола (7 *мл* меркаптоэтанола доливают дистиллированной водой до 100 *мл*), pH доводят 2 н. раствором KOH (7—10 капель) до 7,0; 3) аденозинтрифосфат (0,05 *M* раствор АТФ, pH 7,0): 151,3 *мг* АТФ · $3H_2O$ растворяют в 4 *мл* дистиллированной воды, устанавливают pH 1 н. раствором KOH равным 7,0, доливают дистиллированной водой до 5 *мл*; 4) хлористый магний (0,1 *M* раствор): 2,03 *г* $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*; 5) стандартный раствор формиата натрия (10^{-3} *M*, pH 8,0) : 68 *мг* формиата натрия растворяют в 50 *мл* дистиллированной воды, 1 н. раствором KOH pH устанавливают равным 7,0, доливают дистиллированной водой до 100 *мл*; 6) хлорная кислота (около 20 раствор в/о): 2 *мл* 70%-ной кислоты разводят дистиллированной водой до 120 *мл*; 7) тетрагидрофолатформилаза (около 200 *ед/мл*): из сухого порошка растворяют 20—30 *мг* в 2 *мл* 0,01 *M* раствора 2-меркаптоэтанола (0,7 *мл* меркаптоэтанола смешивают с дистиллированной водой и объем доводят до 100 *мл*).

Раствор АТФ сохраняют замороженным при —20°. Все остальные растворы, включая раствор фермента, хранят при 0—4°. Раствор ТГФ сохраняют в запаянных стеклянных трубочках, из которых эвакуирован воздух. Он хранится от 2 до 4 недель.

Техника. *Подготовка исследуемого материала*. Если анализируют мочу, пробы ее нейтрализуют, и их можно анализировать

[1] Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

без дальнейшей предварительной обработки. При анализе крови содержащийся в ней фермент отделяют посредством дистилляции замороженной пробы, подкисленной раствором серной кислоты, в вакууме, и анализируют дистиллят [1]. Формиат, образовавшийся при расщеплении йодатом полигидроксильных соединений, также может быть определен этим методом. Присутствие $NaJO_3$ до 5 *мкмолей/мл* и Na_2SO_4 до 3,6 *мкмолей/мл* не мешает определению

Постановка опыта. Измерение ведут против контрольного опыта при длине волны 350 *ммк*, толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 3,0 *мл*. Реактивную смесь готовят из следующих растворов: 1 объем буферного раствора (1), 1 объем раствора АТФ (3), 1 объем раствора $MgCl_2$ (4), 2 объема раствора ТГФ (2).

В пробирки (диаметр 1,1 *см*, длина 10 *см*) отмеривают пипеткой для опыта — 0,5 *мл* реактивной смеси, пробу [1] или стандартный раствор (5), дистиллированную воду до 0,9 *мл*; для холостого опыта — 1—0,5 *мл* реактивной смеси, 0,4 *мл* дистиллированной воды, пробу [2] или стандартный раствор, дистиллированную воду до 1 *мл*; для контрольного опыта — 0,5 *мл* реактивной смеси и 0,5 *мл* дистиллированной воды. Все пробирки ставят на 2 мин. в водяную баню при 37°. В главный опыт и в пустой опыт (П) при помощи пипетки Ланг — Леви вносят, помешивая, 0,1 *мл* (500—1000 ед.) раствора фермента (7). После каждого добавления фермента выжидают 30 сек. Все пробирки держат в водяной бане при 37° ровно 10 мин., начиная с момента добавления. Затем во все пробирки приливают пипеткой 2,0 *мл* хлорной кислоты (6); осажденный белок отцентрифуговывают. Через 10—30 мин. после добавления кислоты измеряют экстинкции опыта (E_0) и обоих пустых опытов (E_1, E_2) против контрольного опыта.

Вычисление. Коэффициент экстинкции 5,10-метенилтетрагидрофолиевой кислоты при 340 *ммк* составляет 24,9 *см²/мкмоля*, отсюда

$$\frac{\Delta E \cdot 3}{24{,}9 \cdot V_p} = \frac{\Delta E}{8{,}3 \cdot V_p} \text{ мкмолей формиата на 1 мл пробы,}$$

где $\Delta E = E_v - E_1 - E_2$; E_v — экстинкция опыта, E_1 — экстинкция пустого опыта 1; E_2 — экстинкция пустого опыта 2; 3 — объем измеренной жидкости в *мл*, V_p — объем пробы, в *мл* в опыте.

Пример [1]. Анализировали пробу мочи. Объем пробы в опыте 0,1 *мл*; $E_v = 0{,}337$; E_1 (без фермента) $= 0{,}066$; E_2 (без мочи) $= 0{,}097$; $\Delta E = 0{,}337 - 0{,}066 - 0{,}097 = 0{,}174$.

$$\frac{0{,}174}{8{,}3 \cdot 0{,}1} = 0{,}21 \text{ мкмоля формиата на 1 мл мочи.}$$

Источники ошибок. Экстинкция пустого значения (E_2) может стать относительно большой, если раствор ТГФ содержит продукты распада этой кислоты. Если E_2 (измерение против кон-

[1] С содержанием от 0,01 до 0,1 *мкмоля* формиата.
[2] См. примечание на стр. 175.

трольного раствора) больше 0,2, следует изготовить свежий раствор ТГФ.

Следующие соединения (в концентрациях 0,01—0,1 *мкмоля* на опыт) не участвуют в реакции: метанол, формальдегид, формамид, ацетат, пируват, формамидин, глицин, формилглицин, формиласпартат, формилглутамат, формилантранилат, формиминаспартат, формиминглутамат, *L*-серин, ксантин, инозиновая кислота, фосфат калия. Формиминоглицин в количестве 0,1 *мкмоля* немного реагирует, предположительно вследствие ферментного расщепления на глицин, формиат и аммиак.

Другие методы определения формиата

Наиболее чувствительный метод — восстановление в формальдегид и определение последнего хромотропной кислотой [2]. Восстановление и реакция окрашивания требуют сильно кислых условий, поэтому данный способ не пригоден для определения формиата в присутствии лабильных к кислотам соединений формиата, которые встречаются в биологическом материале. Другие способы основаны на манометрическом измерении CO_2, которая образуется из формиата с препаратами фермента из Escherichia coli с тетрацетатом свинца или церийсульфатом [3]. Недостатком этих методов является то, что они требуют относительно много формиата (2,5—20 *мкмолей* на 1 *мл* пробы) и применения ферментов, стабильных только в течение 24 час., а также реагируют на пируват или требуют отделения муравьиной кислоты посредством дистилляции с водяным паром.

Приготовление тетрагидрофолиевой кислоты (ТГФ). Фолиевая кислота гидрируется H_2 при атмосферном давлении над катализатором (окись платины). Из 160 *мг* окиси платины приготовляют взвесь в 25 *мл* ледяной уксусной кислоты, восстанавливают ее H_2, добавляют через боковое отверстие сосуда взвесь 500 *мг* фолиевой кислоты в 25 *мл* ледяной уксусной кислоты, размешивают магнитной мешалкой, пока не закончится поглощение водорода, раствор отсасывают через стеклянную воронку, в которой находится промытый уксусной кислотой слой целита. Фильтрат собирают в сосуд, в котором вслед за этим можно лиофилизировать полученную жидкость. Фильтрат лиофилизируют в темноте, остаток (ацетат *DL*-тетрагидрофолиевой кислоты — мол. вес. 560, белый порошок) сохраняют в эвакуированном эксикаторе при —10°. Материал при этих условиях становится понемногу коричневым, однако после хранения в течение нескольких месяцев распавшийся на 40—50% материал все еще пригоден для опыта.

Определение глиоксиловой кислоты [3а] [1]

Метод основан на действии НАД-H_2 и редуктазы глиоксиловой кислоты на глиоксиловую кислоту. При этом образуется гликоле-

[1] Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

вая кислота и НАД, что позволяет закончить анализ измерением убыли экстинкции НАД-H_2 при 366 (или 340) *ммк*. Детали анализа см. [3а].

Определение уксусной кислоты [4] [1]

Принцип. Препарат фермента из голубиной печени катализирует реакции:

$$\text{ацетат} + \text{АТФ} \rightarrow \text{ацетил-АМФ} + \text{ФФ}; \quad (1)$$

$$\text{ацетил-АМФ} + \text{КоА (кофермент А)} \rightarrow \text{ацетил-КоА} + \text{АМФ}; \quad (2)$$

$$\text{ацетил-КоА} + \text{сульфаниламид} \rightarrow \text{ацетилсульфаниламид} + \text{КоА}. \quad (3)$$

При благоприятных условиях образуется ацетилсульфаниламид с выходом 85%. Чтобы определить очень малые концентрации ацетата в крови и тканях и избежать нарушений со стороны других веществ, пробу концентрируют перед ферментативной реакцией посредством диффузии в чашках Конвея. Это необходимо и из-за чувствительности ферментов к щелочной реакции.

Реактивы: 1) хлорная кислота (5%-ный раствор в/в): 4,3 *мл* хлорной кислоты (70%) разбавляют дистиллированной водой до 100 *мл*; 2) едкий натр (2,3 *М*) + цитрат (0,5 *М*): 9,2 *г* едкого натра + 10,5 *г* моногидрата лимонной кислоты растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*; 3) цитратный буферный раствор (0,5 *М*, pH 3,0): 10,5 *г* моногидрата лимонной кислоты растворяют в небольшом количестве воды, доводят посредством 1 н. раствора едкого натра pH до 3,0 (стеклянный электрод), доливают дистиллированной водой до 100 *мл*; 4) смесь кофермента (достаточно для 200 анализов): 300 *мг* АТФ $NaH_2 \cdot 3H_2O$ и 5 *мг* кофермента А растворяют в 5 *мл* дистиллированной воды; прибавляют 3,0 *мл* 0,02 *М* раствора сульфаниламида (172 *мг* растворяют в воде и объем доводят до 50 *мл* водой), 2,0 *мл* 1 *М* раствора цитрата калия (16,22 *г* $K_3C_6H_5O \cdot 7H_2O$ растворяют в воде и дополняют до 50 *мл*) и 0,5 *мл* раствора 0,1 *М* хлорида магния (7); 5) цистеин-хлоргидрат (0,3 *М* раствор): 1,57 *г* хлоргидрата цистеина растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 20 *мл*; 6) трис-буферный раствор (1,0 *М*, pH 8,1): 12,1 *г* триса (гидроксиметиламинометан) растворяют в 80 *мл* дистиллированной воды, устанавливают соляной кислотой pH равным 8,1 (стеклянный электрод) и дополняют дистиллированной водой до 100 *мл*; 7) хлорид магния (0,1 *М* раствор): :2,03 *г* $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ растворяют в дистиллированной воде и объем доводят до 100 *мл*; 8) стандартный раствор уксусной кислоты (17,5 *М*): 100 *мкл* ледяной уксусной кислоты разводят дистиллированной водой до 100 *мл*; 9) трихлоруксусная кислота (5%-ный раствор, в/о): 50 *г* трихлоруксусной кислоты растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 1000 *мл*; 10) нитрат натрия (0,1%-ный

[1] Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

раствор, в/о): 200 *мг* нитрата натрия растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 200 *мл*; ежедневно изготовляют заново; 11) амидосульфоновая кислота (0,5%-ный раствор, в/о): 1 *г* амидосульфоновой кислоты растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 200 *мл*; 12) N-нафтилэтилендиаминдигидрохлорид (0,1%-ный раствор, в/о): 200 *мг* вещества растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 200 *мл*; 13) раствор фермента; продажный препарат, замороженный в ампулах, подвергают оттаиванию непосредственно перед употреблением.

Смесь кофермента (раствор 4) замораживают в запаянных стеклянных ампулах при —20°, сохраняется по меньшей мере несколько месяцев. Остальные реактивы хранят при 4°.

Раствор цистеина и нафтилэтилендиамина возобновляют по крайней мере ежемесячно. Раствор фермента сохраняют в стеклянных ампулах при — 20° (остается пригодным еще через год).

Техника. Анализ состоит из четырех этапов: 1) осаждение белков; 2) диффузия в чашках Конвея; 3) ферментативная реакция; 4) реакция с сульфаниламидом. Так как реакция протекает не полностью, то одновременно анализируют стандартные растворы ацетата. Кроме того, необходимо знать результаты для смеси одних лишь реактивов (слепой опыт).

Подготовка исследуемого материала (метод был проверен на гомогенатах ткани и плазме крови, но может быть применен с небольшими изменениями и для других биологических материалов).

Слепой опыт. 1 объем хлорной кислоты (1) нейтрализуют 1 н. раствором едкого натра, доливают водой до 2 объемов и добавляют 0,1 объема цитратного буферного раствора (3). Эту «слепую» смесь проводят через всю работу. Если реактивы достаточно очищены, то экстинкция слепой смеси, инкубированной с ферментом, лишь на 0,020—0,030 ниже экстинкции необработанной слепой смеси, которая соответствует первоначальному содержанию сульфаниламида. Стандартное значение определяют одновременно; применяют «слепую» смесь с ацетатом, для чего 50 *мл* стандартного раствора ацетата (8) добавляют к 10 *мл* «слепой» смеси. 2 *мл* этого раствора соответствуют 10,5 *мкг* уксусной кислоты.

Связь между концентрацией и разницей экстинкций прямолинейна приблизительно вплоть до 15 *мкг* ацетата в основном опыте.

Если концентрация ацетата высока, то безбелковый материал соответственно разводят. Калибровочные кривые с 4—5 концентрациями, например 4, 7, 12, 14, 16 *мкг* ацетата, должны приблизительно ежемесячно заново подвергаться контролю. Стадия диффузии при этом может быть выпущена.

Осаждение белков лучше всего удается с хлорной кислотой. Хорошие результаты дает также метафосфорная кислота. Плазму крови с 1 объемом раствора хлорной кислоты (1) хорошо смешивают и центрифугируют; через 10 мин. 2 *мл* надосадочной жидкости доводят раствором едкого натра (цитрата) до pH 3. Надосадочную жидкость других материалов следует нейтрализовать едким натром

и соединить с буферным раствором (3) цитрата. Надосадочную жидкость сохраняют на холоде.

Постановка опыта. Чашку Конвея № 1 загружают 8—10 *г* твердого сульфата натрия [1] в наружном кольце. Соль слегка спрессовывают кольцеобразным пестиком из плексигласа. В центральную камеру чашки устанавливают цилиндрическую чашечку из плексигласа, загруженную 0,6 *мл* 0,033 *М* раствора едкого кали. Чашки Конвея охлаждают до 4°, отмеряют пипеткой 2 *мл* холодной надосадочной жидкости с pH, доведенным до 3, и наносят ее на слой сульфата натрия. Чашки Конвея закрывают и оставляют стоять приблизительно при 4°, чтобы ускорить кристаллизацию сульфата натрия. Диффузия заканчивается после 24-часового стояния при комнатной температуре.

Пластмассовые чашки вынимают, и чашки Конвея с содержимым высушивают при 80—90 в течение получаса. Непосредственно перед употреблением приготовляют следующий раствор для инкубации: 2 объема смеси кофермента (4), 6 объемов трис-буферного раствора (6), 1 объем раствора цистеина (5), 1 объем раствора хлорида магния (7); все это хорошо смешивают. В каждую чашку Конвея отмеривают пипеткой 200 *мкл* 0,1 н. раствора соляной кислоты и 250 *мкл* инкубационного раствора. Содержимое чашки основательно смешивают, из каждой чашки берут 400 *мкл* и вносят в центрифужную пробирку, снабженную стеклянной палочкой. Сюда же отмеривают пипеткой 150—250 *мкл* раствора фермента (13). Через растворы в течение 20 сек. продувают азот и инкубируют их при 37°. Затем осаждают белки 2,00 *мл* холодного раствора трихлоруксусной кислоты (9), центрифугируют 10 мин.

Для определения непревращенного сульфаниламида отмеривания пипеткой должны быть особо точными. В пробирку отмеривают: 9 *мл* 0,9 н. раствора соляной кислоты, 1 *мл* безбелковой надосадочной жидкости ферментной реакционной смеси, 1 *мл* раствора нитрата натрия (10), смешивают и через 2—3 мин. добавляют 1 *мл* раствора амидосульфоновой кислоты (11) для разрушения избытка нитрата, сильно встряхивают, чтобы стимулировать образование азота, и через несколько минут наливают 1 *мл* реактива N-нафтилэтилендиамина (12). Экстинкцию растворов (красных, подобно перманганату) измеряют при 540 *ммк*.

Вычисление. Количество ацетата в 2 *мл* безбелковой надосадочной жидкости, равно как и в стандартных растворах, составит:

$$\frac{\Delta E_a}{\Delta E_s} \cdot 10{,}5 \text{ мкг ацетата}$$

$\Delta E_a = E$ «слепой» смеси — E пробы; $\Delta E_s = E$ «слепой» смеси — — E стандартного раствора, 10,5 — количество ацетата (в *мкг*) в 2 *мл* стандартного раствора. Концентрация ацетата в плазме крови

[1] Безводный сульфат натрия (не содержащий примеси ацетата) перед анализом смешивают в ступке приблизительно с 5% $Na_2SO_4 \cdot 10H_2O$.

составляет:

$$\frac{2,11}{2,00} \cdot \frac{\Delta E_a}{\Delta E_s} \cdot 10,5 \approx 11 \cdot \frac{\Delta E_a}{\Delta E_s} \text{ мкг ацетата в 1 мл плазмы,}$$

если исходят из содержания 8% сухого вещества. С другим биологическим материалом вычисление проводят подобным же образом.

Источники ошибок. Муравьиная и пировиноградная кислоты не мешают реакции. Пропионат дает около 0,7%, бутират— 1,3%, валерианат — 0,4% изменения окраски, которую получают с эквивалентным количеством ацетата. Поэтому данные вещества не могут считаться источниками ошибок. Ацетоуксусная кислота реагирует с ферментом голубиной печени, но если применяют описанную технику диффузии, то и это вещество не мешает определению ацетата даже при концентрациях бо́льших, чем 1 *мг/мл* плазмы. Ацетилкофермент А относительно стабилен; описанным здесь способом он не учитывается; ацетиладениловая кислота, наоборот, лабильна и быстро гидролизуется при pH 2. Поэтому ацетиладениловая кислота, вероятно, определяется совместно как свободный ацетат. Точность метода 3—4%.

Определение ацетоуксусной кислоты [5][1]

Принцип. Дегидрогеназа *D*-(—)-β-оксибутирата катализирует реакцию:

$$D\text{-(—)-β-оксибутират} + \text{НАД}^+ \rightleftarrows \text{ацетоацетат} + \text{НАД-Н} + \text{H}^+.$$

Константа равновесия этой реакции $K_{(H^+)} = 1{,}45 \cdot 10^{-9}$ при 25°.

При pH 7,0 и избыточном количестве НАД-H_2 ацетат восстанавливается по меньшей мере на 98% при одновременном окислении эквивалентного количества НАД-H_2; измеряют уменьшение экстинкции НАД-H_2 при 340 *ммк*.

Реактивы. Препарат фермента обычно загрязнен малатдегидрогеназой и следами полиолдегидрогеназы. Поэтому присутствие в испытуемом материале оксалацетата, подвергающегося воздействию малатдегидрогеназы, мешает определению ацетоацетата. Его (оксалацетат) можно удалить предварительной инкубацией пробы с малатдегидрогеназой. При анализе животной ткани, вследствие незначительной концентрации в ней оксалацетата и нестабильности этого соединения, предварительная инкубация обычно не нужна. Полиолдегидрогеназа медленно восстанавливает *D*-фруктозу в присутствии НАД-H_2: 1) фосфатный буферный раствор (0,1 *M*, pH 7,0): а) 13,6 *г* KH_2PO_4 растворяют в дистиллированной воде и объем доводят до 1000 *мл*, б) 17,41 *г* K_2HPO_4 растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 1000 *мл*. Растворы *а* и *б* смешивают в соотношении объемов 39 : 61, проверяют значение

---

[1] Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

pH смеси со стеклянным электродом: 2) хлорная кислота (около 30% в/о раствор): 40 *мл* 60%-ной кислоты разводят дистиллированной водой до 120 *мл*; 3) раствор едкого калия (около 20% в/о): 20 *г* KOH растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*; 4) восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (около $6 \cdot 10^{-3}$ *М* раствор НАД-H_2): 10 *мг* НАД-Н-Na_2 растворяют в 2 *мл* дистиллированной воды. Концентрацию раствора устанавливают таким образом, чтобы экстинкция 0,1 *мл* после разведения до 3,1 *мл* при длине волны 340 *ммк* и толщине слоя 1 *см* составляла 0,09—1,0; 5) дегидрогеназа *D*-(—)-β-оксибутирата (около 1000 *ед*[1]/*мл*). Раствор при необходимости разводят 0,01 *М* фосфатным буферным раствором (pH 7,6) до 1000 *ед/мл*. Раствор НАД-H_2 сохраняют при —15°. Раствор фермента сохраняется при 2—4° по меньшей мере месяц. Остальные реактивы хранят закупоренными при комнатной температуре.

Техника. *Подготовка исследуемого материала.* Метод применялся для определения ацетоацетата в крови, сыворотке и инкубационной жидкости со срезами ткани. Кровь тотчас после взятия охлаждают и как можно быстрее осаждают белки, чтобы избежать неферментативного декарбоксилирования ацетоацетата, которое ускоряется кровью (при инкубации (37°) крови с 1 *мкмолем* ацетоацетата на 1 *мл* в течение 1 часа распадаются 40% кетокислоты).

Исследуемый материал смешивают с раствором хлорной кислоты, осажденный белок отцентрифуговывают, избыточную хлорную кислоту удаляют осажденной в виде соли калия.

Например, при работе с кровью в коническую центрифужную пробирку емкостью 15 *мл* отмеривают пипеткой: 3 *мл* раствора хлорной кислоты (2) охлаждают в ледяной бане, добавляют 3 *мл* хлорной (2—4°) крови, основательно смешивают тонкой стеклянной палочкой, 10 мин. дают постоять на ледяной бане, затем 10 мин. центрифугируют при 3000 *g*. Надосадочную жидкость декантируют, измеряют объем надосадочной жидкости; добавляют 0,005 *мл* универсального индикатора, медленно добавляют раствор едкого калия (3), пока окраска не перейдет из красной в зеленую или сине-зеленую (pH 7—8). Требуется 1,8—2 *мл* раствора едкого калия. Отмечают израсходованный объем. Раствору дают постоять около 30 мин. в ледяной бане, потом 10 мин. центрифугируют при 3000 *g*. Надосадочную жидкость декантируют и анализируют.

Постановка опыта. Измерение ведут при длине волны 340 *ммк*; толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 3,1 *мл*; измерение ведут против сравнительной кюветы с 3,1 *мл* дистиллированной воды. Для каждой серии измерений в кювету помещают 0,20 *мкмоля* (20,4 *мкг*) ацетоацетата. Если кювет достаточно, то можно одновременно анализировать до 12 проб.

---

[1] Единица — это количество фермента, которое при 340 *ммк* приводит к изменению экстинкции на 0,010/*мин* в системе: 100 *мкмолей* трис-буфера (pH 7,4); 0,5 *мкмолей* НАД-H_2; 10 *мкмолей* ацетоацетата; конечный объем — 30 *мл*.

В кюветы вносят пипеткой: 1,0 *мл* буферного раствора (1); 2,0 *мл* пробы (содержащей 0,05—0,2 *мкмоля* ацетоацетата); 0,1 *мл* раствора НАД-H_2 (4).

Контрольная кювета: 1,0 *мл* буферного раствора (1); 2,0 *мл* дистиллированной воды; 0,1 *мл* раствора НАД-H_2 (4).

Хорошо смешивают, измеряют экстинкцию E_1, затем во все кюветы (включая кювету сравнения) вносят, помешивая, 0,025 *мл* раствора фермента (5), и каждые 5 мин. измеряют экстинкцию, пока не будет закончена реакция (около 20 мин.). Конечное (константное) значение экстинкции — значение E_2.

Вычисление:

$$\frac{(\Delta E_v - \Delta E_k)\cdot 3{,}1}{6{,}22} = 0{,}498\,(\Delta E_v - \Delta E_k)$$

мкмолей ацетоацетата в смеси опыта

или

$$\frac{(\Delta E_v - \Delta E_k)\cdot 3{,}1\cdot 102}{6{,}22} = 50{,}8\,(\Delta E_v - \Delta E_k)$$

мкг ацетоуксусной кислоты в смеси опыта.

$\Delta E_v = E_1 - E_2$ в кювете опыта, $\Delta E_k = E_1 - E_2$ в контрольной кювете, 3,1 — объем анализируемой жидкости, *мл*, 6,22 — коэффициент экстинкции НАД-H_2 при длине волны 340 *ммк* (*см²/мкмоль*), 102 — молекулярный вес ацетоуксусной кислоты.

Пример. Были найдены следующие значения:

Кювета опыта: $E_1 = 0{,}950$; $E_2 = 0{,}830$, $\Delta E_v = 0{,}120$.

Контрольная кювета: $E_1 = 0{,}945$; $E_2 = 0{,}935$; $\Delta E_k = 0{,}010$

$$\Delta E_v - \Delta E_k = 0{,}120 - 0{,}010 = 0{,}110.$$

Таким образом, кювета опыта содержала $0{,}110\cdot 0{,}498 = 0{,}548$ *мкмоля* ацетоацетата или $0{,}110\cdot 50{,}8 = 5{,}59$ *мкг* ацетоуксусной кислоты.

Источники ошибок. Оксалацетат и *D*-фруктоза ингибируют реакцию образования ацетоацетата. Первый может быть удален посредством предварительной инкубации пробы с малатдегидрогеназой (см. стр. 181). В присутствии *D*-фруктозы постоянное конечное значение экстинкции достигается очень медленно. Так как восстановление *D*-фруктозы происходит гораздо медленнее, чем ацетоацетата, такое нарушение может быть исправлено посредством экстраполяции. Однако при анализе материала методом, описанным выше, с мешающим влиянием оксалацетата или *D*-фруктозы можно не считаться.

В описанной здесь смеси опыта можно определить наряду с ацетоацетатом также и пируват, α-кетоглутарат и оксалацетат посредством добавления лактатдегидрогеназы или глутаматдегидрогеназы. С дегидрогеназой *D*(—)-β-оксибутирата можно определить также *D*-(—)-β-оксибутират. Точность метода около 5%.

Определение щавелевоуксусной кислоты [5а]

Метод основан на восстановлении щавелевоуксусной кислоты действием НАД-H_2 и малатдегидрогеназы, что позволяет провести анализ, измеряя убыль экстинкции, вызванной дегидрированием НАД-H_2. Детали определения см. [5а].

Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

Определение *D*-глицериновой кислоты [6]

П р и н ц и п. Аденозинтрифосфат (АТФ) в присутствии глицераткиназы [1] фосфорилирует *D*-глицериновую кислоту в 2-фосфоглицерат, который действием енолазы [2] преобразуется в фосфоенолпируват; последний переводится пируваткиназой [3] в пируват. Пируват, согласно уравнению (4), может быть редуцирован НАД-H_2, уменьшение экстинкции НАД-H_2 служит мерилом для превращенного количества *D*-глицериновой кислоты. Так как равновесие реакции (4) лежит далеко справа, то *D*-глицериновая кислота превращается количественно:

$$D\text{-глицериновая кислота} + \text{АТФ} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{2-фосфоглицерат} + \text{АДФ}; \qquad (1)$$

$$\text{2-фосфоглицерат} \underset{}{\overset{Mg^{2+}}{\rightleftarrows}} \text{фосфоенолпируват}; \qquad (2)$$

$$\text{фосфоенолпируват} + \text{АДФ} \overset{K+Mg^{2+}}{\rightleftarrows} \text{пируват} + \text{АТФ}; \qquad (3)$$

$$\text{пируват} + \text{НАД-Н} + H^{+} \rightleftarrows L\text{-лактат} + \text{НАД}^{+} \qquad (4)$$

$$D\text{-глицериновая кислота} + \text{НАД-Н} + H^{+} \rightarrow D\text{-лактат} + \text{НАД}^{+}.$$

Р е а к т и в ы: 1) трис-буферный раствор (0,2 *М*, pH 7,4): 2,43 *г* трис (гидроксиметиламинометана) растворяют примерно в 50 *мл* бидистиллированной воды; приблизительно 2 *мл* 2 н. раствора HCl доводят pH (стеклянный электрод) до 7,4; после выравнивания температуры доливают до 100 *мл* и еще раз проверяют значение pH; 2) сульфат магния (0,5 *М* раствор): 1,25 *г* $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ растворяют в бидистиллированной воде и доводят объем до 10 *мл*; 3) хлористый калий (0,5 *М* раствор): 0,37 *г* KCl растворяют в бидистиллированной воде и доводят объем до 10 *мл*; 4) восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (около 10^{-2} *М* раствор НАД-H_2): 10 *мг* НАД-Н-Na_2 растворяют в бидистиллированной воде до 1 *мл*; 5) аденозинтрифосфат (0,2 *М* раствор АТФ): 119 *мг* АТФ-$Na_2H_2 \cdot 3H_2O$ растворяют в 1,0 *мл* бидистиллированной воды; 6) лактатдегидрогеназа, ЛДГ (5 *мг* белка на 1 *мл*), продажный препарат; если нужно, соответственно разводят 2,2 *М* раствором сульфата аммония; 7) пиру-

---

[1] КФ 2.7.131.
[2] КФ 4.2.1.1.
[3] КФ 2.7.1.40.

ваткиназа, ПК (2 *мг* белка на 1 *мл*); торговый препарат; если нужно, разводят соответственно 2,1 *М* раствором сульфата аммония; 8) енолаза (2 *мг* белка на 1 *мл*), продажный препарат; если нужно, разводят соответственно 2,6 *М* раствором сульфата аммония; 9) *D*-глицераткиназа[1] (3 *мг* белка на 1 *мл*); взвесь фермента; если нужно, разводят 1,2 *М* раствором сульфата аммония.

Т е х н и к а. Относительно подготовки материала (тканей, крови и др.) см. определение пировиноградной кислоты.

Постановка опыта. Измерение ведут при длине волны 366 *ммк* в кварцевых кюветах. Толщина слоя 2,0 *см*, объем анализируемой жидкости 4,0 *мл*; измерение ведут против воды. Толщина слоя и объем жидкости могут быть изменены, если опыт надо сделать более чувствительным. Буферный раствор и раствор пробы приводят к комнатной температуре.

В кюветы последовательно отмеривают пипеткой: в кювету опыта — 1,70 *мл* буферного раствора (1), 0,06 *мл* раствора $MgSO_4$ (2), 0,06 *мл* раствора KCl (3), 0,06 *мл* раствора НАД-H_2 (4), 0,03 *мл* раствора АТФ (5), 0,02 *мл* взвеси ЛДГ (6), 0,02 *мл* взвеси ПК (7), 0,03 *мл* взвеси *D*-глицераткиназы (9), пробу (1 или 2 *мл*) + H_2O до 3,98 *мл*; в контрольную кювету — 1,70 *мл* буферного раствора (1), 0,06 *мл* раствора $MgSO_4$ (2), 0,06 *мл* раствора KCl (3), 0,06 *мл* раствора НАД-H_2 (4), 0,06 *мл* раствора АТФ (5), 0,02 *мл* взвеси ЛДГ (6), 0,02 *мл* взвеси ПК (7), 0,03 *мл* взвеси *D*-глицераткиназы (9), H_2O до 3,98 *мл*.

Отмечают экстинкцию E_1 смеси в обеих кюветах. Если в кюветах не наблюдается изменения экстинкций больше 0,001—0,002 за 30 сек., то в обе кюветы добавляют 0,02 *мл* взвеси енолазы (8) и этим начинают реакцию. За экстинкциями E_2 обеих кювет наблюдают до тех пор, пока в кюветах нельзя отметить никакого изменения (или лишь назначительное, одинаковое для обеих кювет) экстинкции (как правило, в течение 20—30 мин.). Выводят разницы $E_1 - E_2$ для кюветы опыта и контрольной, соответствующие $\Delta E_{опыт}$ и $\Delta E_{сравн}$. $\Delta E_{сравн}$ — поправка для неспецифических изменений экстинкции, вызванных добавлением фермента и незначительными побочными реакциями вследствие загрязнений; $\Delta E = \Delta E_{опыт} - \Delta E_{сравн}$ есть изменение экстинкции, вызванное превращением *D*-глицерата. На контрольных опытах с известными количествами *D*-глицерата можно убедиться, что ЛДГ, ПК и *D*-глицераткиназа не содержат енолазы. Если это так, то енолазу следует добавлять сначала и начинать реакцию с *D*-глицераткиназой.

Вычисление. $\frac{\Delta E\, V}{3{,}3 \cdot d}$ *мкмолей* *D*-глицерата в содержимом кюветы, где ΔE — изменение экстинкции; V — содержимое кюветы (в *мл*); d — толщина слоя (в *см*); 3,3 — коэффициент экстинкции (*см*^{2}/*мкмоль*) для НАД-H_2 при длине волны 366 *ммк*.

И с т о ч н и к и о ш и б о к. Если проба, наряду с *D*-глицератом, содержит другие метаболиты, которые могут реагировать в

[1] Глицераткиназа 27.1.31.

этой системе опыта, то они одновременно определяются в том же опыте. В частности, в описанной выше системе может быть определен пируват, восстановление которого в лактат начинается сразу после добавления лактатдегидрогеназы. Только после этого добавляют остальные ферменты, так же как АТФ, причем могут быть определены фосфоенолпируват и 2-фосфоглицерат. В этом случае превращение D-глицерата начинается под действием не енолазы, а D-глицераткиназы. Точность метода 5%.

Определение L-(+)-молочной кислоты [7]

Принцип. Лактатдегидрогеназа (см. стр. 187) катализирует дегидрирование молочной кислоты (лактата) никотинамидадениндинуклеотидом (НАД):

$$L\,(+)\text{ лактат} + \text{НАД}^{+} \rightleftarrows \text{пируват} + \text{НАД-Н} + \text{Н} \qquad (1)$$

Равновесие реакции лежит далеко на левой стороне. Константа равновесия составляет: $K_c = 2{,}9 \cdot 10^{-12}$ *молей/л* (при 25°). Для количественного дегидрирования L-лактата должны быть удалены продукты этой реакции: протоны связываются щелочной реакционной средой, пируват улавливается в качестве гидразина по уравнению

$$L\text{-}(+)\text{-лактат} + \text{НАД} + \text{гидразин} \xrightarrow[\text{pH } 9{,}5]{\text{ЛДГ}} \text{пируват-гидразон} + \text{НАД-Н} + H_3O^{+}$$

Константа равновесия этой реакции составляет $K_c \approx 7 \cdot 10^2$ при 25° и рН 9,5. Для количественной и достаточно быстрой (см. ниже «Источники ошибок») реакции нужны относительно высокие концентрации НАД и лактатдегидрогеназы. Течение реакции измеряют спектрофотометрически (увеличение экстинкции при образовании НАД-H_2).

Реактивы[1] (все реактивы изготовляют на свежеприготовленной бидистиллированной воде): 1) карбонат калия (около 2*М* раствор): приблизительно 69 *г* K_2CO_3 растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*; 2) метилоранжевый индикатор: около 50 *мг* метилоранжа растворяют в дистиллированной воде и объем доводят до 100 *мл*; 3) хлорная кислота (около 6% раствора по весу): около 7,7 *мл* хлорной кислоты (плотность 1,67) разводят дистиллированной водой до 150 *мл*; 4) гидразинглицин, буферный раствор (0,4 *М* гидразина, 1 *М* глицина, рН 9,5): 7,5 *г* глицина, 5,2 *г* гидразинсульфата, 0,2 *г* ЭДТА-$Na_2H_2 \cdot 2H_2O$ суспендируют в небольшом количестве дистиллированной воды, добавляют 51 *мл* 2 н. раствора NaOH и дополняют дистиллированной водой до 100 *мл*; 5) никотинамидадениндинуклеотид (около $5 \cdot 10^{-2}$ *М* НАД): 40 *мг* НАД растворяют в дистиллированной воде до конечного объема 1 *мл*;

---

[1] Примерно до 20 определений.

6) лактатдегидрогеназа, ЛДГ (около 5 мг белка на 1 мл): суспензию фермента (примерно 10 мг белка на 1 мл в 2,1 *М* растворе сульфата аммония) разводят соответственно дистиллированной водой.

Все реактивы сохраняют закупоренными в холодильнике при 0—4°. Раствор НАД не нуждается в нейтрализации ввиду высокой емкости гидразинглицинового буферного раствора и может сохраняться неделями. Щелочной гидразинглициновый буферный раствор можно употреблять только в течение недели; лучше всего изготовлять основной раствор из гидразинсульфата, глицина и динатрий-ЭДТА. Он практически сохраняется неограниченное время и по мере надобности может устанавливаться раствором едкого натра на значении рН 9,5.

Техника. *Подготовка материала.* Кровь берут из незастойной вены и непосредственно после взятия осаждают белки. Для исследования плазмы тотчас после взятия крови при охлаждении отцентрифуговывают эритроциты. Пробы тканей замораживают в доли секунды и не дают оттаивать до осаждения белков.

Для осаждения белков исследуемый материал смешивают с раствором хлорной кислоты. Для экстракции есть две возможности: однократная экстракция и вычисление объема экстракции на основании принятого среднего содержания воды в исследуемом материале или повторная и благодаря этому количественная экстракция ткани. Первый способ применим при определении только лактата; второй способ следует предпочесть, когда определяют еще такие трудно экстрагируемые метаболиты, как органические соединения фосфорной кислоты в том же экстракте и др. Целесообразно работать с одним и тем же отношением объем экстракта : вес ткани, равным 8 : 1. При однократной экстракции применяют следующие количества хлорной кислоты: для 1 *г* крови — 7,2 *мл*, для 1 *мл* крови — 7,15 *мл*, для 1 *г* ткани — 7,25 *мл* ее раствора. В общем достаточно двух экстракций. При соблюдении названного выше сотношения (8 : 1) ошибка вследствие остающегося в осадке вещества составляет максимально 3—4%.

Техника. В центрифужные пробирки помещают стеклянную мешалку и 5 *мл* раствора хлорной кислоты (3) и взвешивают. Добавляют около 1 *г* исследуемого материала (кровь сливают непосредственно из канюли, ткань пульверизируют в замороженном состоянии), немедленно смешивают и снова взвешивают.

Однократная экстракция. Исходя из величины взятой навески ткани и соотношения 8 : 1, вычисляют требуемый объем хлорной кислоты (см. выше) и дополняют имевшиеся до этого количества в пробирке 5 *мл* раствора хлорной кислоты. Суспензию основательно помешивают, крошки ткани на стенках сосуда растирают стеклянной палочкой и центрифугируют 5 мин. при 3000 *g*. Надосадочную жидкость переливают для нейтрализации в охлажденный сосуд емкостью 10 *мл*.

Многократная экстракция. Суспензию исследуемого материала в 5 *мл* хлорной кислоты хорошо размешивают (в особых случаях —

гомогенизатором) и немедленно центрифугируют при 3000 *g*. Надосадочную жидкость декантируют, осадок взбалтывают в 1 *мл* раствора хлорной кислоты (3) + 1 *мл* дистиллированной воды и доливают дистиллированной водой из расчета 8 *мл* жидкости на 1 *г* веса ткани.

К 8 *мл* экстракта добавляют пипеткой 0,02 *мл* раствора индикатора (2), интенсивно размешивают магнитной мешалкой и при охлаждении льдом прибавляют из пипетки емкостью 1 *мл* около 0,1 *мл* раствора карбоната (1). Выжидают, пока пена с CO_2 почти исчезнет, и добавляют еще раствор карбоната, пока пена на станет цвета семги (розово-красной) (pH около 3,5). Всего потребуется около 1,6 *мл* раствора карбоната. Смесь выдерживают 10 мин. в ледяной воде, декантируют от осадка хлората или отсасывают пипеткой. Аликвоту применяют для определений.

Постановка опыта. Отношение общий объем анализируемого раствора : объем пробы не должно превышать 2 : 1, чтобы буферный раствор гидразинглицина не был разведен слишком сильно. Целесообразно выбирать постоянно одинаковую степень разведения, чтобы (при вычислении результатов) измеренные разницы экстинкций умножать лишь на один и тот же установленный фактор. Необходима контрольная (для сравнения) кювета, которая содержит, за исключением пробы, тот же раствор, что и кювета опыта, ибо НАД образует с гидразином комплекс. Последний реагирует относительно медленно с ЛДГ (но не с глутамат-малат- и глицерин-1-фосфатдегидрогеназой), образуя соединение, которое поглощает в близкой области УФ сильнее, чем комплекс гидразин-НАД.

1. Измерения проводят против контрольной кюветы при длине волны 340 или 334 *ммк*, толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 1,01 *мл*. Отмеривают: в кювету опыта — 0,45 *мл* гидразинглицинового буферного раствора (4), 0,05 *мл* раствора НАД (5), 0,10 *мл* безбелкового экстракта, 0,04 *мл* дистиллированной воды; в контрольную кювету — 0,45 *мл* гидразинглицинового буферного раствора (4), 0,05 *мл* раствора НАД (5), 0,150 *мл* дистиллированной воды.

2. Для измерения экстинкции при 336 *ммк* (толщина слоя — 1 *см*; объем анализируемой жидкости — 0,01 *мл*, замеры против контрольной кюветы) берут: в кювету опыта — 0,45 *мл* гидразинглицинового буферного раствора (4), 0,05 *мл* раствора НАД (5), 0,30 *мл* воды, 0,20 *мл* безбелкового экстракта; в контрольную кювету — 0,45 *мл* гидразинглицинового буферного раствора (4), 0,05 *мл* раствора НАД (5), 0,50 *мл* дистиллированной воды.

Содержимое кювет основательно перемешивают, доводят до комнатной температуры и дважды отсчитывают экстинкцию E_1 с промежутком в 3 мин. Затем добавляют при размешивании к содержимому кюветы опыта 0,01 *мл* суспензии ЛДГ (6). После окончания реакции (10—20 мин. после добавления фермента, в зависимости от концентрации лактата) два раза отсчитывают экстинкцию E_2 с промежутком 3 мин. Изменения начальной экстинкции E_1 и конечной экс-

тинкции E_2 в течение 3 мин. обычно бывают незначительными и могут не учитываться при сравнении с разницей экстинкций $\Delta E = E_2 - E_1$.

Величина ΔE не должна быть при 340 *ммк* больше 1,0 (соответственно $\Delta E_{366} \approx 0,56$).

Если E_2 через 20 мин. после добавления фермента продолжает увеличиваться, в то время как начальная экстинкция E_1 в течение 3 мин. остается постоянной, то это указывает на недостаточную активность лактикодегидрогеназы [1]. Чтобы проверить эффективность опыта, в кювету опыта добавляют после окончания реакции 0,01 *мл* 0,002 *M* раствора *L*-лактата. По истечении 10—20 мин. повышение экстинкции должно окончиться. Экстинкцию E_3 отсчитывают дважды в течение 3 мин. и получают $\Delta E^1 = E_3 - E_2$. При приведенных условиях ΔE^1 должна составлять при 340 *ммк* 0,123, при 366 *ммк* — 0,065.

Вычисление. Превращение *L*-лактата происходит количественно. Содержание его в пробе может быть поэтому вычислено из разницы экстинкций.

$$\frac{\Delta E_{\text{развед}}}{\varepsilon \cdot d} \textit{ мкмолей } L\text{-}(+)\text{-лактата в 1 } г \text{ ткани},$$

где ΔE — разница экстинкций $(E_2 - E_1)$, разведение — общее разведение пробы, ε — коэффициент экстинкции (в *см²/мкмоль*), d — толщина слоя (в *см*). Если выбирают постоянно одни и те же условия разведения, то уравнение упрощается:

$$\Delta E_2 \cdot \Phi = \textit{мкмоли } L\text{-}(+)\text{-лактата в 1 } г \text{ ткани},$$

где Ф — разведение $\varepsilon \cdot d$.

Если отношение объем экстракта : вес ткани = 8 : 1, то объем нейтрализованного экстракта : вес ткани = 8,2 : 1. Разведение экстракта в опыте равно 10,1 : 1 (при 334 и 340 *ммк*) и 5,05 : 1 (при 366 *ммк*).

Общее разведение равно 82,8 : 1 (при 332 и 340 *ммк*) и 41,4 : 1 (при 366 *ммк*). На основании этого вычисляют для Ф: при 334 *ммк* — 13,6; 340 *ммк*—13,2; 366 *ммк*—12,5; при 366 *ммк* коэффициент экстинкции несколько зависит от температуры:

$$E^{25°}_{366\ ммк} = 3,3\ см^2/мкмоль;$$

$E^{1°}_{366\ ммк} = 3,36$ *см²/мкмоль*, приведенные значения для Ф относятся к 25°.

Пример. К 5 *мл* хлорной кислоты было прибавлено 1,348 *г* крови здорового человека. Чтобы достигнуть величины отношения кровь : хлорная кислота (*г/мл*) 1 : 7,2, смесь дополнили раствором хлорной кислоты до 1,348·7,2 = 9,72 *мл* и нейтрализовали 2 н. раствором NaOH. Измерение проводилось при 340 *ммк* против контрольной

[1] КФ 11.1.27.

кюветы. Толщина слоя — 1 *см*. До прибавления ЛДГ: 0 мин. E_1 = 0,083; через 3 мин. E_1 = 0,084; после прибавления ЛДГ: через 12 мин. E_2 = 0,187; через 15 мин. E_2 = 0,188; $\Delta E = E_2 - E_1$ = 0,187—0,083 = 0,104; 0,104·13,1 = 1,36 *мкмоля* *L*-(+)-лактата в 1 *г* крови.

В том же опыте могут быть определены и другие метаболиты (посредством добавления специфических ферментов), например *L*-(—)-глицерин-1-фосфат (α-глицерофосфат) и *L*-(—)-малат.

Источники ошибок. 1. Если в течение 30 мин. не достигается постоянного конечного значения экстинкции, то это указывает на недостаточную активность лактатдегидрогеназы. Тогда следует проверить активность фермента и применить бо́льшие количества фермента или взять новый препарат его.

2. Начальная экстинкция может быть непостоянной по следующим причинам: а) содержимое кюветы не было доведено до комнатной температуры до начала измерения; б) гидразинглициновый буферный раствор хранился более 8 дней; в) препарат НАД не очищен; г) собственная окраска тканевого экстракта не постоянна. В последнем случае измерения ведут против контрольной кюветы, которая содержит, за исключением фермента, тот же раствор, что и кювета опыта.

3. Добавление фермента может вызвать скачок экстинкции. Если экстинкция повышается, то в большинстве случаев слишком высока «собственная» абсорбция света препаратом фермента. Чтобы устранить это, применяют новый препарат фермента. Если же экстинкция понижается, то гидразинглициновый буферный раствор слишком щелочной. При pH 9,6 исходная экстинкция смеси опыта больше. Добавление раствора фермента влечет за собой увеличение содержания сульфата аммония, который понижает значение pH и, таким образом, вызывает «отрицательный» скачок экстинкции.

4. Экстинкция может проходить через максимум (главным образом при более высокой температуре, например 37°). Причина — самоокисление НАД-H_2. В этом случае анализ повторяют.

В условиях опыта определяется только *L*-(+)-лактат, *D*-лактат не реагирует. Рацематы участвуют в реакции лишь на 50%. Кроме *L*-(+)-лактата, в незначительной степени реагируют еще и α-оксибутират и β-хлорлактат. В эквимолярном количестве эти соединения, не встречающиеся в физиологических условиях, вызывают повышение значения анализа на 8,4 или 6,3%. При соблюдении прописи точность метода может быть доведена до 2—3%. Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

Определение молочной кислоты [8]

Принцип. Молочная кислота при помощи фермента лактатдегидрогеназы в присутствии НАД переводится в пировиноградную кислоту, которая удаляется из сферы реакции, превращаясь в гидразон пировиноградной кислоты. В качестве акцептора водорода используется краситель хлорид-3-*п*-нитрофенил-2-*п*-йодфенилтет-

разолия. Количество образовавшегося в ходе реакции формазана определяют спектрофотометрически.

Р е а к т и в ы: 1) стандартный раствор молочной кислоты в 5%-ном растворе трихлоруксусной кислоты (34 *мкг/мл*); 2) 5%-ный раствор трихлоруксусной кислоты; 3) арсенитный буфер, 0,1 *М* раствор As_2O_3 (титрованием раствором едкого натра отрегулировать pH до 9,6); 4) диафораза [1] (НАД-H_2-липоамидоксидоредуктаза) *; 5) хлорид-3-*n*-нитрофенил-2-*n*-йодфенилтетразолия (НИТ)-1 *мг/мл**; 6) 0,1 *М* раствор сернокислого гидразина (отрегулировать pH до 7,0); 7) 0,5%-ный раствор желатина; 8) никотинамидадениндинуклеотид (НАД); 9) лактатдегидрогеназа (ЛДГ) кристаллическая (готовят разведением 1 : 10 в 0,1 *М* арсенитном буфере, pH 9,6); 10) 1 н. раствор соляной кислоты.

Т е х н и к а. Берут 20—30 *мг* ткани (количество молочной кислоты должно быть не меньше 1,7 *мкг* и не больше 17 *мкг*) и переносят в пробирки емкостью 10 *мл*, куда добавляют 5%-ный раствор трихлоруксусной кислоты до получения общего объема смеси 0,5 *мл*. В контрольную пробу берут 0,5 *мл* 5%-ной трихлоруксусной кислоты, в стандартную — от 0,05 до 0,5 *мл* основного стандартного раствора и трихлоруксусной кислоты, до общего объема смеси 0,5 *мл*, затем добавляют в опытные и стандартные пробы 0,1 *М* арсенитный буферный раствор в количестве 1,3 *мл* и 1,5 *мл* — в контрольную пробу для предотвращения денатурации энзима и помутнения. Далее, ко всем пробам прибавляют по 2 *мл* свежеприготовленной реакционной смеси, содержащей (в 2 *мл*) 0,01 *мл* диафоразы, 1 *мл* водного раствора НИТ (5), 0,1 *мл* 0,1 *М* раствора сернокислого гидразина, 0,1 *мл* 5%-ного желатина, 4 *мг* НАД (8) и 0,79 *мл* 0,1 *М* раствора арсенитного буфера. Сразу же после внесения этой реакционной смеси во все пробы, кроме контрольной, прибавляют по 0,2 *мл* раствора кристаллической лактатдегидрогеназы. После 30-минутного стояния при комнатной температуре в пробы добавляют по 0,5 *мл* 1 н. раствора соляной кислоты для остановки реакции. В процессе реакции образуется формазан, количество которого определяют спектрофотометрически при длине волны 500 *ммк*; фотометрирование проводят против контроля. Детали анализа см. [8].

Важно, чтобы конечная концентрация ТХУ в исследуемых безбелковых фильтратах соответствовала 5% и была одинаковой во всех анализируемых образцах. Реакционную смесь нужно готовить непосредственно перед употреблением и после нее сразу же должно следовать добавление лактатдегидрогеназы. В этом залог получения малых значений контроля. Следует отметить, что другие оксикислоты в ограниченной степени также могут служить субстратами для лактатдегидрогеназы. Авторы получили прямую пропорциональность в пределах 2,8—17,4 *мкг* молочной кислоты.

Описанный метод специфичен для натурального *L*-(+)-изомера молочной кислоты. По данным авторов, он отличается чувствитель-

[1] КФ 1.6.4.3.

* Приготовление см. [8].

ностью. Простота метода и небольшие количества ткани, требуемые для определения молочной кислоты (20—30 *мг*), составляют дополнительные преимущества этого метода.

Определение молочной кислоты [9]

Принцип. Молочная кислота окисляется никотинамидадениндинуклеотидом (НАД) в пировиноградную кислоту. Реакция протекает стехиометрически; количество восстановленного никотинамидадениндинуклеотида НАД-H_2 определяют по увеличению экстинкции при 340 *ммк*. Метод разработан для анализа кала.

Реактивы*: 1) гидрат гидразина, 5 *М* раствор; 2) глициновый буферный раствор: 0,5 *М* раствор глицина в 0,4 *М* растворе гидразина; 3) никотинамидадениндинуклеотид (НАД); 4) дегидрогеназа молочной кислоты **; 5) спиртовой раствор соляной кислоты: 0,1 н. раствор соляной кислоты в 30%-ном (по объему) этаноле; 6) исходный н. раствор молочной кислоты (сохраняют при 4°); 7) рабочий 0,002 н. стандартный раствор молочной кислоты на алкогольном растворе кислоты; приготовляют перед употреблением, разбавляя исходный раствор молочной кислоты; 0,1 *мл* рабочего стандартного раствора должен содержать 18 *мкг* молочной кислоты *.

Техника. *Подготовка исследуемого материала.* 2 *г* свежесобранного материала помещают в предварительно взвешенные склянки объемом 28 *мл*, снабженные притертыми пробками. В каждую склянку предварительно наливается по 8 *мл* спиртового раствора соляной кислоты (5). При отборе проб пользуются деревянными лопаточками. Склянки встряхивают и взвешивают повторно. Если вес образца превышает 3 *г*, добавляют соответствующее количество алкогольного реактива. Количество молочной кислоты, содержащееся в исследуемом материале, после помещения образца в спиртово-кислотный реактив не изменяется при хранении в течение 48 час. как при низких температурах от — 20 до 4°, так и при комнатной температуре.

Подготовка опыта. После того как исследуемый материал доставлен в лабораторию, склянки вновь взвешивают и их содержимое переносят в универсальные контейнеры. Контейнеры плотно закрывают и помещают в аппарат для встряхивания на 5 мин., а затем центрифугируют в течение 5 мин.; надосадочную жидкость подвергают ультрафильтрации через специальные трубки [9]. С этой целью трубки различной длины (12 × 0,7 *см*) вымачивают в дистиллированной воде с добавлением нескольких капель хлороформа. Влажные трубки достают и перевязывают двойными узлами на нужной длине. Излишнюю воду удаляют встряхиванием, каждый мешочек, полученный описанным методом, прикрепляют к отводку «гребешка», подсоединенного к компрессору с двойным редуктором; после выдерживания мешочков под повышенным давлением в те-

* Детали приготовления растворов см. [9].
** КФ 1.1.1.27.

чение 1 часа они готовы к употреблению. Мешочки заполняют исследуемым материалом, присоединив к аппарату, оставляют под давлением 1 *кг/см*^{2} в течение 3—4 час. Ультрафильтрат должен быть совершенно прозрачным, однако нередко он бывает слегка пигментирован.

Определение проводят в следующих сериях, содержащих по две параллельные пробы:

Реактивы, *мл*	слепая проба, *мл*	анализируемая проба, *мл*	слепая проба с анализируемым материалом, *мл*	стандарт, *мл*
Спиртовой раствор кислоты	0,2	—	—	0,1
Ультрафильтрат	—	0,2	0,2	—
0,002 н. мол. к-та	—	—	—	0,01
Глициновый буфер	3	3	3	3
Дегидрогеназа мол. к-ты	0,03	0,03	—	0,03
НАД	0,2	0,2	—	0,2

После перемешивания пробирки оставляют при комнатной температуре на 1 час, затем определяют экстинкцию при 340 *ммк*, поместив исследуемую жидкость в кварцевые кюветы толщиной 1 *см*.

Вычисление *.

$$\frac{\text{Показание анализируемой пробы} - \text{показание слепой пробы}}{\text{показание стандарта} - \text{показание слепой пробы}} \times \frac{18}{2} \times$$

$$\times \frac{8 + \text{вес } (\textit{г}) \text{ материала, взятого в анализ}}{\text{вес } (\textit{г}) \text{ материала, взятого в анализ}} =$$

$$= \textit{мг} \text{ молочной кислоты в 100 } \textit{г} \text{ исследуемого материала.}$$

Источники ошибок. Если исследуют кал, то пробы, взятые для анализа, должны быть незамедлительно помещены в фиксирующий раствор, в противном случае будут получены ошибочные данные. Значительное искажение результата исследования может произойти, если ультрафильтрат окажется хотя бы слегка мутным. Точность метода, по данным авторов, 3—4%.

Лоомис [10] предложил ферментативный флуорометрический метод количественного определения молочной кислоты в сыворотке крови. Метод основан на ферментативном превращении молочной кислоты в пировиноградную при помощи лактатдегидрогенезы ЛДГ в присутствии НАД:

$$\text{молочная кислота} + \text{НАД} \xrightarrow{\text{ЛДГ}} \text{НАД - H}_2 + \text{пировиноградная кислота.}$$

Для полного завершения реакции образующуюся пировиноградную кислоту связывают семикарбазидом.

Количество образующегося НАД-H_2, эквивалентное количеству молочной кислоты, определяют флуорометрически по Лоури*: 0,1 *мл*

* Детали вычисления см. [9].

сыворотки или стандартного раствора, содержащего от 0 до 50 *мг* молочной кислоты в 100 *мл*, помещают в пробирку на 20 *мл*, прибавляют раствор 0,5 *мг* лактатдегидрогеназы и 2,0 *мг* НАД в 1 *мл* 0,1 *М* глицинового буфера, содержащего 5 *г* семикарбазида на 100 *мл*, доведенного раствором едкого натра до pH 10,5; выдерживают 90 мин. при 25°, разбавляют до 15—25 *мл* 0,02 *М* раствором едкого натра, содержащим 0,35 *г* ЭДТА в 1 *л*, и флуорометрируют. Преимуществом предложенного метода является его простота (метод не требует предварительного осаждения белков).

Результаты, полученные при определении этим методом содержания молочной кислоты в сыворотке крови здоровых людей, хорошо совпадают с данными, полученными при помощи колориметрического метода Баркера. Детали анализа см. [10].

Определение пировиноградной и молочной кислоты [11]

П р и н ц и п. Дегидрогеназа молочной кислоты (ЛДГ — см. стр. 195) в присутствии НАД-H_2 катализирует восстановление пировиноградной кислоты в молочную:

$$\text{НАД-}H_2 + \text{пировиноградная кислота} \rightleftarrows \text{НАД}^+ + \text{молочная кислота.}$$

Равновесие сдвинуто в сторону образования молочной кислоты, что удобно для определения последней. Если требуется определить пировиноградную кислоту, сдвиг равновесия в сторону ее образования достигается тремя путями: проведением ферментативной реакции в щелочной среде, увеличением концентрации НАД или связыванием продукта реакции семикарбазидом. Количество продукта реакции определяется по изменению оптической плотности раствора при 340 *ммк* (образование восстановленной формы НАД).

Р е а к т и в ы: 1) хлорная кислота, 3% и 6%-ный растворы (по объему); 2) стандартный раствор пировиноградной кислоты готовят, растворяя 110,1 *мг* кристаллического пирувата натрия в 100 *мл* 3%-ного раствора хлорной кислоты. Из этого исходного раствора приготовляют разведения, содержащие 0,1, 0,4 и 0,02 *мкмоля* пировиноградной кислоты в литре, служащие для построения калибровочной кривой. Исходный раствор сохраняют при температуре 5°; 3) стандартный раствор молочной кислоты: отвешивают 2,17 *г* молочной кислоты, содержащей 41,5 *г* вещества в 100 *мл*, и разбавляют это количество 3%-ным раствором хлорной кислоты до 200 *мл*. Для построения калибровочной кривой из исходного раствора готовят стандартные растворы следующих концентраций: 0,001 *М*, 0,002 *М* и 0,003 *М*, разбавляя исходный раствор 3%-ным раствором хлорной кислоты. Исходный стандартный раствор сохраняют при температуре 5°; 4) едкий натр, 2 н. раствор; 5) НАД, 0,02 *М* раствор: 266 *мг* НАД растворяют в 10 *мл* дистиллированной воды, доводят pH с 3 до 6 добавлением нескольких капель 2 н. раствора едкого натра; если раствор окажется перещелоченным, следует приготовить свежий, поскольку НАД весьма нестоек при слабощелоч-

ной реакции; объем раствора доводится до 20 *мл*. Этот раствор приготовляют ежедневно; 6) глицин-семикарбазидный буферный раствор 0,2 *М*, pH 10: 1,5 *г* глицина и 2,2 *г* солянокислого семикарбазида растворяют в 80 *мл* воды, доводят pH до 10 добавлением около 10 *мл* 2 н. раствора едкого натра и затем разбавляют водой до объема 100 *мл*. Буферный раствор готовят ежедневно; 7) раствор фосфата калия в едком кали, 1,1 *М*: 18,5 *г* двузамещенного фосфата калия растворяют в 90 *мл* дистиллированной воды и добавляют 10 *мл* 50%-ного (по весу) раствора едкого кали, раствор сохраняют при 5°; 8) фосфатный буферный раствор 0,1 *М*, pH 7,5: 84,1 *мл* 0,1 *М* раствора двузамещенного фосфата натрия смешивают с 15,9 *мл* 0,1 *М* раствора однозамещенного фосфата калия; 9) восстановленный НАД; препарат хранят при 5° в эксикаторе с безводным хлористым кальцием, в темноте. Непосредственно перед употреблением отвешивают количество НАД, нужное для приготовления раствора с концентрацией 1 *мг/мл*, и растворяют в соответствующем объеме 0,1 *М* раствора фосфатного буфера; 10) дегидрогенеза молочной кислоты (ЛДГ); препарат, получаемый из мышц кролика в виде кристаллической суспензии, обычно содержит 65 *мг/мл* белка (1 *мг* этого препарата при pH 7,5 и температуре 37° окисляет 60 *мкмолей* НАД); для определения молочной кислоты следует приготовить раствор фермента в дистиллированной воде, содержащий 2 *мг/мл* белка. Для определения пировиноградной кислоты готовят раствор, содержащий 5 *мг/мл* в 0,1 *М* фосфатном буферном растворе. Растворы могут храниться не долее 72 час. при температуре 5°.

Техника. *Исследуемый материал*. В центрифужную пробирку объемом 12 *мл* с делениями, снабженную притертой пробкой, наливают 6 *мл* 6%-ной хлорной кислоты и охлаждают в рефрижераторе до 5°. Кровь (6 *мл*) берут из вены без накладывания жгута, давая ей стечь непосредственно в пробирку с хлорной кислотой. Пробирку встряхивают и центрифугируют при 3000 *об/мин* в течение 10 мин. Записывают как общий объем жидкости в пробирке, так и объем надосадочной жидкости. В некоторых случаях надосадочную жидкость следует процентрифугировать повторно.

Определение пировиноградной кислоты

3 *мл* безбелкового центрифугата и такие же количества стандартного раствора и 3%-ного раствора хлорной кислоты наливают в пробирки, в которые предварительно налито по 1 *мл* раствора фосфата калия в едком кали. Смесь ставят на лед на 15 мин. до полного осаждения хлората калия, затем из каждой пробирки берут по 2 *мл* прозрачной надосадочной жидкости и переносят в кварцевые кюветы спектрофотометра, оставляют стоять в течение 15—20 мин. для того, чтобы растворы приняли комнатную температуру, затем в каждую кювету добавляют по 0,7 *мл* фосфатного буфера и по 0,2 *мл* НАД, измеряют оптическую плотность при 340 *ммк* (R_1). Второй отсчет берется после добавления в каждую кювету по 0,1 *мл* ЛДГ (содержащую 5 *мг/мл* белка) и стояния в течение 1 мин. (R_2).

Определение молочной кислоты

В кварцевые кюветы емкостью 1 *см* наливают по 2,8 *мл* глицин-семикарбазидного буфера, 0,2 *мл* раствора НАД и 0,2 *мл* исследуемого материала (надосадочной жидкости), 3%-ного раствора хлорной кислоты (слепое определение) и стандартного раствора. Содержимое кювет перемешивают 5-кратным опрокидыванием, предварительно покрыв их парафильмом, и определяют оптическую плотность при 340 *ммк* (R_1). Затем в каждую кювету добавляют по 0,4 *мл* ЛДГ, кюветы инкубируют при 40° в течение 1 часа и берут второй отсчет (R_2).

Вычисление. Количество пировиноградной кислоты рассчитывается по следующей формуле:

$$A = 0{,}97\ (R_1 - R_2), \qquad (1)$$

где 0,97 —коэффициент*, A — понижение оптической плотности НАД-H_2,

R_1 — оптическая плотность смеси в кювете до добавления фермента (ЛДГ),

R_2 — оптическая плотность смеси в кювете через 1 мин. после добавления фермента (ЛДГ).

Показания слепого определения обычно крайне назначительны и могут не приниматься в расчет при определении пировиноградной кислоты. Значение A, полученное по формуле, пересчитывают на содержание пирувата в 100 *мл* исследуемого материала.

Оптическую плотность НАД-H_2, образующегося в результате ферментативного окисления молочной кислоты, рассчитывают по формуле:

$$A = (R_2 - 0{,}9R_1) - (B_2 - 0{,}9B_1),$$

где A — оптическая плотность НАД-H_2, R_1 — первый отсчет оптической плотности НАД-H_2 в смеси с исследуемым материалом, R_2 — второй отсчет той же смеси после инкубации с ЛДГ, B_1 и B_2 — соответствующие отсчеты, взятые при слепом определении, 0,9 — коэффициент (см. [11]).

Значение A пересчитывают на содержание молочной кислоты в 100 *мл* исследуемого материала.

Источники ошибок. Оптическая плотность находится в строгой линейной зависимости от содержания пировиноградной кислоты в пределах концентрации последней от 10 до 100 *мкмолей/л*. Если концентрация пирувата в исследуемом материале превышает эту величину, то безбелковый центрифугат следует разбавлять 3%-ным раствором хлорной кислоты.

При содержании в исследуемом материале молочной кислоты выше 300 *мкмолей/л* зависимость оптической плотности от концентрации молочной кислоты отклоняется от линейного отношения: с

* Возможно эмпирически взятый; в оригинале не указано.

другой стороны, количества молочной кислоты, не превышающие 20 *мкмолей/л*, дают показания оптической плотности, близкие к показаниям слепого определения; при серийных определениях молочной и пировиноградной кислот в крови обычно бывает достаточным разбавление безбелкового исследуемого материала 3%-ным раствором хлорной кислоты в отношении 1 : 1.

Точность метода (по данным авторов) около 3%.

Определение пировиноградной кислоты [2]

П р и н ц и п. Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) [1] катализирует гидрирование пировиноградной кислоты (пирувата) восстановленным никотинамидадениндинуклеотидом (НАД-H_2):

$$\text{пируват} + \text{НАД-}H_2 \rightleftarrows \text{лактат} + \text{НАД}.$$

Равновесие реакции лежит далеко на правой стороне. При практически допустимом избытке НАД-H_2 реакция протекает быстро и количественно переводит пируват в лактат. Измеряют понижение экстинкции НАД-H_2.

Р е а к т и в ы (примерно для 20 определений) [2]: 1) карбонат калия (5 *М* раствор): растворяют 72 *г* K_2CO_3 в бидистиллированной воде и объем доводят до 100 *мл*; 2) индикатор метилоранж (0,05%-ный раствор): 50 *мг* вещества индикатора растворяют в 100 *мл* бидистиллированной воды; 3) хлорная кислота (~ 6%-ный раствор): 7,8 *мл* 70%-ной хлорной кислоты разводят бидистиллированной водой до 150 *мл*; 4) буферный раствор триэтаноламина (0,4*М* раствор, pH 7,6): 18,6 *г* триэтаноламингидрохлорида растворяют в 200 *мл* бидистиллированной воды, добавляют 18 *мл* 2 н. раствора едкого натра и 3,7 *г* ЭДТА-$Na_2H_2 \cdot 2H_2O$ и доливают бидистиллированной водой до 250 *мл*; 5) восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (около $5 \cdot 10^{-3}$ *М* раствор НАД-H_2): 7 *мг* НАД-Н-Na_2 растворяют в 1,5 *мл* бидистиллированной воды; 6) лактатдегидрогеназа, ЛДГ (около 10 *мг* белка на 1 *мл*): взвесь фермента соответственно разводят 2,1 *М* раствором сульфата аммония.

Все реактивы сохраняют закупоренными в холодильнике при 0—4°. Раствор НАД-H_2 следует еженедельно возобновлять. Остальные растворы сохраняются почти неограниченно долго, поскольку не возникает роста микроорганизмов.

Т е х н и к а. *Подготовка исследуемого материала.* Кровь берут из незастойной вены и, непосредственно после взятия, осаждают белки. Анализ сыворотки, вследствие гликолитической активности форменных элементов крови, не дает воспроизводимых результатов. Для исследования плазмы форменные элементы должны быть удалены в кратчайшее время (при охлаждении) после взятия крови. Для определения в тканях проба должна быть заморо-

[1] КФ 1.1.1.27.
[2] Чтобы затормозить рост микроорганизмов в растворах, все склянки пропаривают до употребления.

жена в течение долей секунды[1]. Она не должна оттаивать до осаждения белков.

Для осаждения белков исследуемый материал смешивают с хлорной кислотой (3). Количество ее зависит от содержания воды в пробе: добавляют столько раствора хлорной кислоты, чтобы совокупный объем жидкости пробы относился к ее первоначальному весу, как 4 : 1. Для крови принято содержание воды 80%, для тканей (печень, почки, мышцы, сердце) — 75%. Отсюда получаются следующие количества хлорной кислоты: к 2 *г* крови добавляют 6,4 *мл* хлорной кислоты (3), к 2 *мл* крови — 6,3 *мл* хлорной кислоты (3), к 2 *г* ткани — 6,5 *мл* хлорной кислоты (3). Отклонения содержания воды от принятого значения на ± 10% обусловливают ошибку результата анализа в ± 2,5%. Целесообразно взвешивать пробы крови. Если предпочитают иметь дело с объемом крови, то следует учитывать, что градуирование продажных шприцев для инъекции может показывать значительные ошибки. Плотность крови для перечисления может быть принята равной 1,06 *г/мл*.

В градуированные центрифужные пробирки со стеклянной мешалкой (толстостенная стеклянная трубочка с раздутым внизу шариком) загружают 4 *мл* хлорной кислоты (3) и взвешивают. Добавляют 2 *мл* исследуемого материала (кровь, непосредственно вытекающая из канюли, или пробы тканей, размолотые в порошок в замороженном состоянии) до тех пор, пока объем не увеличится на 2 *мл*, смешивают и снова взвешивают. Из увеличения веса вычисляют требуемый общий объем хлорной кислоты (количества см. выше) и добавляют ее в пробирки до этой величины. Суспензию основательно перемешивают. Через 5 мин. (для замороженных тканевых проб, начиная от момента полного оттаивания) центрифугируют в течение 5 мин. при ускорении $\geqslant 3000$ *g*. Если на поверхности остаются хлопья белка, их отделяют покачиванием и повторяют центрифугирование. Затем отмеривают пипеткой в охлажденный сосуд (например, флакончик для пенициллина) 4,00 *мл* надосадочной жидкости и 0,01 *мл* раствора индикатора (2).

При интенсивном помешивании магнитной мешалкой медленно подливают из 0,2-миллилитровой капиллярной пипетки около 0,1 *мл* карбоната (раствор 1) для нейтрализации и ждут, пока пена CO_2 почти полностью исчезнет (можно недолго встряхивать), затем дальше титруют, пока не будет достигнута соответствующая окраска индикатора — цвета семги (pH около 3,5). Требуется всего около 0,14 *мл* раствора карбоната. В течение 10 мин. отстаивают в ледяной воде, декантируют от осажденного хлората калия или отсасывают пипеткой. Для анализа берут аликвоту.

Постановка опыта. Соотношение объем опыта : объем безбелкового раствора рекомендуется подобрать для измерения при различной длине волн так, чтобы упростить последующие вычисления.

---

[1] Например, при помощи жидкого воздуха по Chance B. a. Spencer E. jr., Faraday Soc. Discussions, 1959, 27, 200.

Измерение ведут против контрольной кюветы, экстинкция которой несколько выше экстинкции исследуемого раствора, за вычетом экстинкции НАД-H_2. Благодаря этому, с одной стороны, область измерения переносится в ту часть шкалы фотометра, которая допускает более четкие отсчеты, а с другой (и при достижении нулевого значения шкалы) — обеспечивает остающийся избыток НАД-H_2.

Растворы доводят до комнатной температуры и в приведенном ниже порядке отмеривают пипеткой в кюветы. Измерение ведут при длине волны 340 *ммк*, 334 или 366 *ммк* против смеси реактивов в контрольной кювете, толщина слоя — 1 *см*. Измерение при 340 *ммк* ведут при объеме анализируемой жидкости 3,041 *мл*. Отмеривают: в кювету опыта — 2,00 *мл* пробы (после осаждения белка), 1,00 *мл* буферного раствора (4), 0,04 *мл* раствора НАД-H_2 (5); в контрольную кювету — 2,00 *мл* буферного раствора (4), 0,03 *мл* раствора индикатора (2).

Измерение при 366 *ммк* ведут в кювете с толщиной слоя жидкости 2 *см*, объем анализируемой жидкости 3,952 *мл*. Отмеривают: в кювету опыта — 2,50 *мл* пробы (после осаждения белков), 1,40 *мл* буферного раствора (4), 0,04 *мл* раствора НАД-H_2 (5); в контрольную кювету — 4,00 *мл* буферного раствора (4) и 0,05 *мл* раствора индикатора (2).

Измерение ведут при длине волны 334 *ммк*. Толщина слоя жидкости 1 *см*, объем анализируемой жидкости — 2,842 *мл*. Отмеривают: в кювету опыта — 2,00 *мл* безбелковой пробы, 0,80 *мл* буферного раствора (4), 0,04 *мл* раствора НАД-H_2 (5); в контрольную кювету — 2,80 *мл* буферного раствора (4) и 0,03 *мл* раствора индикатора (2).

Начальную экстинкцию E_1 отсчитывают дважды с промежутками в 3 мин. Затем в кювету опыта маленьким стеклянным шпателем вносят 0,001 или 0,002 *мл* суспензии ЛДГ (6) — количество ее зависит от того, при какой длине волны ведут измерение — и взбалтывают. Через 3 и 6 мин. после прибавления фермента отсчитывают конечное значение E_2.

Сдвиги экстинкций E_1 и E_2 обычно так малы, что их можно не учитывать по сравнению со сдвигом экстинкции в течение 3 мин. Если же величина E_2 несколько больше, то ее можно вычесть из убыли экстинкции. Убыль экстинкции $\Delta E = E_1 - E_2$ входит в вычисление (в некоторых случаях после исправления).

Если при реакции не достигается нулевого значения шкалы фотометра и т. д., т. е. имеющееся количество НАД-H_2 оказывается недостаточным, то можно поступать следующим образом: после окончания реакции в опытную кювету дополнительно отмеривают пипеткой 0,05 *мл* раствора НАД-H_2 (5) и отсчитывают новое конечное E_3. В третью кювету отмеривают пипеткой следующие объемы буферного раствора триэтаноламина (4): 3,0 *мл* — для измерения при длине волны 340 *ммк*; 4 *мл* — для измерения при 366 *ммк*; 2,8 *мл* — для измерения при 334 *ммк*; экстинкцию E_4 измеряют против воздуха. В эту (третью) кювету отмеривают пипеткой, кроме

того, 0,05 *мл* раствора НАД-H_2 (5) и измеряют E_5 против воздуха. Прирост экстинкции $E_5 - E_4 = \Delta E_2$ прибавляют к начальной экстинкции E_1 кюветы опыта и из суммы ($E_1 + \Delta E_2$) вычитают конечное значение E_3: $E_1 + \Delta E_2 - E_3 = E$ (включают в вычисление).

Вычисление. В приведенных условиях реакция протекает стехиометрически. Содержание пирувата может быть вычислено по формулам:

$$\frac{\Delta E \cdot v}{\varepsilon \cdot d} = \text{мкмолям пирувата в главном опыте} \qquad (2)$$

или

$$\frac{\Delta E \cdot v}{\varepsilon \cdot d \cdot A} = \text{мкмолям пирувата на 1 г ткани,} \qquad (3)$$

где v — объем главного опыта (в *мл*);

A — аликвота ткани (в *г*) $= \dfrac{\text{г ткани, мл экстракта, взятого в опыт}}{\text{мл всего экстракта}}$;

ε — коэффициент экстинкции НАД-H_2 (значение см. ниже);

d — толщина слоя кюветы (в *см*).

При работе описанным методом эти вычисления лишние, так как отношение объем опыта : объем пробы, взятой в опыт после осаждения белков, было так рассчитано, что v/A в числовом значении равно $E \cdot d$. Если в уравнении (3) заменить числовое значение для v на $\varepsilon \cdot d \cdot A$, то ΔE в числовом значении равно *мкмолям* пирувата на 1 *г* ткани.

Для решения уравнения (2) выбирают: при 366 *ммк* ($\varepsilon = 3{,}3$ *см²/мкмоль*) толщина слоя $d = 2$ *см*, отношение $v : A = 6{,}6$; при 340 *ммк* ($\varepsilon = 6{,}3$ *см²/мкмоль*) толщина слоя $d = 1$ *см*, отношение $v : A = 6{,}3$; при 334 *ммк* ($\varepsilon = 5{,}9$ *см²/мкмоль*) толщина $d = 1$ *см*, отношение $v : A = 5{,}9$. Для 366 *ммк* отношение $v : A = 6{,}6$ достигается объемом теста $v = 3{,}952$ *мл* и содержанием $A = 0{,}602$ *г* ткани в 2,5 *мл* пробы после осаждения белков (подбирать условия осаждения белков!) ($v : A = 3{,}952 : 0{,}602 \approx 6{,}6$).

Осаждение белков из тканей обусловливает при любом способе ошибку в $\pm 2\%$ при перечислении анализа на имеющееся количество ткани. Поэтому нет необходимости учитывать незначительные колебания, вызванные добавлением раствора карбоната калия для нейтрализации.

Если содержание пирувата в ткани незначительно, рекомендуется проводить измерения при 340 и 334 *ммк* и увеличивать толщину слоя кюветы. Нельзя рекомендовать уменьшение отношения хлорная кислота : ткань.

Пример. Для анализа взята кровь здорового человека. К 4 *мл* хлорной кислоты добавляют 2,16 *г* крови. Чтобы достигнуть требуемого отношения кровь : хлорная кислота (2 *г* крови : 6,4 *мл* хлорной кислоты), к $2{,}16/2 \cdot 6{,}4 - 6{,}9$ *мл* добавляют 2,9 *мл* раствора хлорной кислоты и перемешивают.

Измерение ведут при 366 *ммк* против контрольной кюветы: до прибавления ЛДГ: 0 мин. $E_1 = 0{,}430$; 3 мин. $E_1 = 0{,}428$; после прибавления ЛДГ: 3 мин. $E_2 = 0{,}322$; 6 мин. $E_2 = 0{,}320$ ΔE
$\Delta E = E_1 - E_2 = 0{,}430 - 0{,}322 = 0{,}108$ *мкмолей* пирувата в 1 *г* (*мл*) крови.

В том же растворе опыта можно анализировать другие метаболиты, добавляя специфические ферменты до или после определения пирувата: например, диоксиацетонфосфат — используя глицерин-1-фосфатдегидрогеназу [1], фруктозо-1,6-дифосфат — с последующим добавлением альдолазы[2] + триозофосфатизомеразы [3].

Источники ошибок. 1. Экстинкция НАД-H_2 при длине волны 366 *ммк* (а не при 340 и 334 *ммк*) несколько зависима от температуры. Поэтому содержимое кюветы, охлажденное добавлением холодного экстракта, следует доводить до комнатной температуры до начала измерения.

2. В эритроцитах находятся меняющиеся количества вещества, которое обусловливает медленное понижение экстинкции НАД-H_2. Это явление иногда встречается при анализах крови, при анализах плазмы не наблюдается, а при анализах ткани встречается редко; приведенный выше способ осаждения белков и составления смеси противодействует этому явлению. Оно выражено больше при малых пропорциях проба/раствор хлорной кислоты, а также при проведении опыта в буферном растворе фосфата. Для поправки достаточно в общем вычесть 3-минутный сдвиг начальной экстинкции или конечное значение из отсчета экстинкции: если сдвиг конечного значения намного превосходит таковой начальной экстинкции, то следует думать (при соблюденной по прописи активности и чистоте примененной ЛДГ) о присутствии медленно реагирующих кетокислот.

3. Наряду с уменьшением содержания НАД-H_2 вследствие переноса водорода на пируват на величину отсчета экстинкции действует также и разведение раствора опыта благодаря добавлению препарата фермента. Добавление в описанном выше методе настолько мало, что поправки не требуется. При добавлении бóльших объемов величина ΔE, согласно пропорции объемов, должна быть поправлена до и после добавления фермента.

Определение пировиноградной кислоты [13]

Принцип. Пировиноградная кислота под влиянием лактатдегидрогеназы [4] восстанавливается в молочную. Это сопровождается окислением восстановленного никотинамидадениндинуклеотида. При pH 6,9 превращение НАД-H_2 в НАД практически протекает до конца и эквимолекулярно превращению пирувата в лактат.

---

[1] КФ 1.1.99.5.
[2] КФ 4.1.2.7; 4.1.2.13.
[3] КФ 5.3.1.1.
[4] КФ 1.1.1.27.

Следовательно, исходная концентрация пирувата может быть непосредственно определена измерением коэффициента экстинкции НАД-H_2.

Реактивы: 1) 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты в 0,5 н. растворе соляной кислоты; 2) 1,1 *М* кислый фосфорнокислый калий : буфер, приготовленный растворением 19,14 *г* K_2HPO_4 в дистиллированной воде и доведением объема до 100 *мл*; 3) $3 \cdot 10^{-3}$ *М* раствор восстановленного НАД-H_2: 1,5 *г/л* (приготовление см. стр. 227 и ссылку [15]); раствор хранится в холодильнике при 4° (годен в течение не более 10 дней); 4) лактатдегидрогеназа (в виде ферментного белка — 0,75 *мг/мл* в растворе сульфата аммония); 5) пировинограднокислый литий.

Техника. В шприц берут приблизительно 5 *мл* крови и сразу же выпускают в 5 *мл* раствора трихлоруксусной кислоты, содержащегося во взвешенной центрифужной пробирке. Пробирку хорошо встряхивают, взвешивают снова и центрифугируют в течение 10 мин. К 2 *мл* прозрачной надосадочной жидкости прибавляют 0,7 *мл* раствора фосфатного буфера, после чего 2 *мл* забуференного фильтрата переносят в кварцевую кювету объемом 5 *мл* (толщина слоя 1 *см*), куда добавляют 1 *мл* раствора фосфатного буфера и 0,05 *мл* (75 *мкг*) НАД-H_2. Растворы хорошо перемешивают.

Все измерения делают против дистиллированной воды при длине волны 340 *ммк* с применением спектрофотометра. Первый отсчет оптической плотности делают через 2 мин. после прибавления НАД-H_2 в кювету. Отсчеты повторяют с минутными интервалами; величина начальной оптической плотности должна лежать в пределах 0,500—0,800 единиц оптической плотности. Затем прибавляют 0,05 *мл* (3,75 *мкг*) лактатдегидрогеназы и содержимое хорошо перемешивают; спустя 2 мин. отмечают оптическую плотность; отсчеты повторяют снова с минутными интервалами в течение 3 мин. Разница экстинкций для нормальной крови, взятой в покое, составляет обычно величину, равную 0,05—0,1 единицы оптической плотности. Анализ контрольной пробы производят в каждой серии определений с заменой фильтрата крови 2 *мл* дистиллированной воды в кювете. Разность экстинкций для контроля на реактивы (0,001—0,005) не должна превышать 0,001—0,005 единиц оптической плотности. Стандартный раствор пирувата лития также анализируют с каждой партией образцов.

Количество пировиноградной кислоты в крови вычисляют по изменению оптической плотности пробы после вычитания экстинкции контроля. Объем крови вычисляют с внесением поправки на удельный вес в данные взвешивания образца крови.

При осаждении белков рекомендуется пользоваться трихлоруксусной, а не хлорной кислотой. Стабильность ТХУ-фильтратов сохраняется в течение 18 час. Концентрация пировиноградной кислоты в крови не должна превышать 0,3 *мкмоля/мл*, при большей концентрации пирувата фильтраты крови должны быть соответственно разбавлены раствором буфера. Как известно, в крови имеются

и другие α-кислоты. Из них наибольшее количество приходится на долю α-кетоглутаровой кислоты, однако раствор, содержащий даже 50 *ммолей* α-кетоглутаровой кислоты, не дает заметного повышения экстинкции исследуемых проб.

Авторы настоящего метода провели сравнение ферментного и 2,4-динитрофенилгидразинового (химического) методов. Химический метод систематически давал более высокие результаты по сравнению с ферментным примерно на 0,025 *ммолей/мл*.

Определение оксипировиноградной кислоты [13а]

Действием НАД-H_2 и лактатдегидрогеназы оксипировиноградную кислоту переводят в *L*-глицерат; на каждый моль оксипирувата окисляется один моль НАД-H_2, что позволяет закончить анализ спектрофотометрически измерением сдвига экстинкции при 336 *ммк*. Детали анализа см. [13а].

Определение *D*-(—)-β-оксимасляной кислоты [14]

П р и н ц и п. Дегидрогеназа *D*-(—)-β-оксибутирата катализирует реакцию:

(1) *D*-(—)-β-оксибутират + НАД ⇄ ацетоацетат + НАД-Н + H^+.

Константа равновесия составляет при 25° $K[H^+] = 1{,}45 \cdot 10^{-9}$. При pH 8,5 *D*-(—)-β-оксибутират окисляется на 40% в ацетоацетат. Если ацетоацетат улавливают в виде гидразона, то реакция протекает полностью слева направо. Измеряют увеличение экстинкции НАД-H_2 при длине волны 340 *ммк*.

Препарат фермента обычно загрязнен малатдегидрогеназой (см. стр. 181) и следами полиолдегидрогеназы. Эта примесь может воздействовать на малат, если он содержится в исследуемой пробе и мешает определению оксибутирата.

Маннит и сорбит, которые обычно не встречаются в животных тканях или встречаются в очень незначительных концентрациях, медленно окисляются в присутствии НАД.

Р е а к т и в ы. 1) трис-буферный раствор (0,1 *М*; pH 8,5): 1,21 *г* трис-оксиметиламинометана растворяют в 50 *мл* дистиллированной воды, добавляют 14,3 *мл* 0,2 н. раствора HCl, доливают дистиллированной водой до 100 *мл*, проверяют значение pH (стеклянный электрод); 2) гидразиновый буферный раствор (pH 8,5): 1 *мл* гидразингидрата смешивают с 5 *мл* 1 н. раствора HCl, доливают дистиллированной водой до 20 *мл*; 3) хлорная кислота (около 30% в/о раствор): 40 *мл* 60%-ной кислоты разводят дистиллированной водой до 120 *мл*; 4) раствор едкого кали (около 20% в/о): 20 *г* KOH растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*; 5) никотинамидадениндинуклеотид (около $1{,}3 \cdot 10^{-2}$ *М* НАД раствор): 20 *мг* НАД растворяют в 2 *мл* дистиллированной воды;

6) дегидрогеназа D-(—)-β-оксибутирата (около 1000 *ед/мл*[1]). Раствор НАД сохраняют при —15°. Раствор фермента сохраняется при 2—4° по меньшей мере 1 месяц; раствор гидразина ежедневно готовят свежим. Остальные растворы хранят закупоренными при комнатной температуре.

Техника. *Подготовка исследуемого материала.* Метод применялся для определения D-(—)-β-оксибутирата в крови, сыворотке и инкубационной жидкости срезов тканей. Он может служить для определения D-(—)-β-оксибутирата в тканевых гомогенах, если они свободны от малата, сорбита и маннита. Безбелковые растворы пробы готовят так, как это описано выше (см. определение ацетоуксусной кислоты).

Постановка опыта. Определение ведут при длине волны 340 *ммк*; толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости — 3,1 *мл*. Измерение ведут против сравнительной кюветы.

Для каждой серии опытов помещают в кювету 0,20 *мкмоля* D-(—)-β-оксибутирата (50 *мкг* DL-оксибутирата на опытную смесь).

Если имеется достаточное количество кювет, то одновременно можно анализировать 12 проб. В кюветы отмеривают пипеткой:

Кювета с опытной смесью	Сравнительная кювета
1,0 *мл* гидразинового буферного раствора (2)	1,0 *мл* гидразинового буферного раствора (2)
0,5 *мл* трис-буферного раствора (1)	0,5 *мл* трис-буферного раствора (1)
1,5 *мл* пробы, содержащей от 0,05 до 0,20 *мкмоля* D-(—)-β-оксибутирата	1,5 *мл* дистиллированной воды
0,1 *мл* раствора НАД (5)	0,1 *мл* раствора НАД (5)

Все хорошо смешивают, измеряют экстинкцию каждые 2 мин., записывают константное начальное значение (E_1), затем в обе кюветы вносят, помешивая, 0,025 *мл* раствора фермента (6) и измеряют экстинкцию каждые 10 мин. до окончания реакции в течение 40—50 мин. Константное конечное значение E_2.

Вычисление. При описанных здесь условиях D-(—)-β-оксибутират окисляется по меньшей мере на 98% при образовании стехиометрического количества НАД-H_2. Таким образом:

$$\frac{\Delta E \cdot 3{,}1}{6{,}22} = 0{,}498 \cdot \Delta E \text{ мкмолей } D\text{-(—)-β-оксибутирата (смесь опыта) или}$$

$$\frac{\Delta E \cdot 3{,}1 \cdot 104}{6{,}22} = 51{,}9 \cdot \Delta E \text{ мкг } D\text{-(—)-β-оксимасляной кислоты (смесь опыта),}$$

где $\Delta E = E_2 - E_1$; 3,1 — объем анализируемой жидкости (*мл*), 6,22 — коэффициент экстинкции НАД-H_2 при 340 *ммк* (*см²/мкмоль*). 104—мол. вес β-оксимасляной кислоты.

[1] Единицей активности фермента считают количество фермента, которое в ниже приводимой системе вызывает изменение экстинкции при 340 *ммк*, равное 0,010/*мин*. Система 100 *мкмолей* трис-буфера (pH 7,4); 0,5 *мкмолей* НАД-H_2; 10 *мкмолей* ацетоацетата; конечный объем — 3 *мл*.

Источники ошибок. Малат, маннит и сорбит ингибируют реакцию, когда в препарате фермента содержится дегидрогеназа малата[1] и сорбита. Точность метода 5%.

Определение α-кетоглутаровой кислоты [15]

Принцип. Глутаматдегидрогеназа, ГДГ (см. ниже) катализирует реакцию:

$$\alpha\text{-кетоглутарат} + \text{НАД-}H_2 + NH_4^+ \rightleftarrows \text{глутамат} + \text{НАД} + H_2O.$$

При избытке ионов NH_4^+ и НАД-H_2 α-кетоглутарат количественно переводится в глутамат. На 1 *моль* α-кетоглутарата окисляется 1 *моль* НАД-H_2. Измеряют убыль экстинкции НАД-H_2 при 340 или 366 *ммк*.

Реактивы (для 15 анализов): 1) фосфат калия: 1 *М* раствор K_3PO_4: 3,2 *г* K_3PO_4 растворяют в бидистиллированной воде, объем доводят до 15 *мл*; 2) восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (около 8.10^{-3} *М* раствор НАД-H_2): 7 *мг* НАД-Н-Na_2 растворяют в 1 *мл* 1%-ного раствора $NaHCO_3$; 3) хлорная кислота (плотность 1,57): 5,2 *мл* 10%-ной хлорной кислоты разбавляют бидистиллированной водой до 100 *мл*; 4) глутаматдегидрогеназа — ГДГ (2 *мг* белка на 1 *мл*): основная взвесь; если нужно, ее разводят соответственно 2,8 *М* раствором сульфата аммония.

Все реактивы сохраняют при 0—4° в холодильнике. Раствор НАД-H_2 еженедельно готовят заново. Суспензия фермента хранится месяцами.

Техника. *Подготовка исследуемого материала.* Кровь берут из незастойной вены. При анализе застойной венозной крови получают невоспроизводимые результаты. Ткань печени, сердца и скелетных мышц должна быть размельчена в гомогенизаторе в хлорной кислоте (3).

Ткань должна быть гомогенизирована через 60 сек. после забоя подопытного животного.

Отмеривают пипеткой в 10-миллилитровую центрифужную пробирку: 5 *мл* раствора хлорной кислоты (3) и 5 *мл* крови; смешивают тонкой стеклянной палочкой; 5—10 мин. центрифугируют при 3000 *g*; 4 *мл* недосадочной жидкости смешивают с 0,8 *мл* (приблизительно) раствора фосфата (1), значение pH должно быть около 7,6. Оставляют стоять на льду 10 мин., затем отфильтровывают от выпавшего хлората калия. Раствор доводят до комнатной температуры и отсюда берут в опыт 3,75 *мл*.

Постановка опыта. Измерения ведут при 340 или 366 *ммк*. Толщина слоя 2 *см*, объем анализируемой жидкости 3,85 *мл*, температура комнатная. Измерение ведется против воздуха или кюветы с водой. В кювету отмеривают пипеткой 3,75 *мл* фильтрата, 0,05 *мл*

---

[1] КФ 1.1.1.37.

раствора НАД-H_2(2), смешивают уплощенной на одном конце стеклянной палочкой и отсчитывают экстинкцию E_1, затем добавляют 0,05 *мл* суспензии ГДГ (4) и приблизительно через 4 мин. отсчитывают конечное значение E_2. Если конечное значение непостоянно, то экстинкцию снова отсчитывают через промежутки в 1 мин. и графически экстраполируют на время ноль, равное моменту добавления ГДГ. Величина $\Delta E = E_1 - E_2$ входит в вычисление. Для каждого препарата фермента после достижения конечного значения снова добавляют 0,05 *мл* суспензии ГДГ (4) и отсчитывают E_3; $E_3 - E_2 = \Delta E_E$ является увеличением экстинкции (большей частью очень незначительным), вызванным небольшими помутнениями суспензии фермента после добавления ГДГ. $\Delta E_Г$ следует вычесть из E_2 до того, как $E_1 - E_2 = \Delta E$ будет введено в вычисление.

Вычисление. Согласно формуле вычисления количество α-кетоглутарата равно: а) измерение при 340 *ммк* —

$$\frac{\Delta E \cdot 3{,}85}{6{,}22 \cdot 2} = \Delta E \cdot 0{,}309$$ *мкмолям* α-кетоглутарата в содержимом кюветы;

б) измерение при 366 *ммк* —

$$\frac{\Delta E \cdot 3{,}85}{3{,}3 \cdot 2} = \Delta E \cdot 0{,}581$$ *мкмолям* α-кетоглутарата (в содержимом кюветы).

Чтобы получить содержание α-кетоглутарата в исследуемой крови, следует учитывать разведения при осаждении белков и нейтрализации экстракта хлорной кислотой. Кровь содержит около 80% жидкости; 1 *мл* крови весит около 1,06 *г*, т. е. в пробе 5 *мл* крови 5,3 *г*, осаждение белков дает:

$$\frac{5{,}3 \cdot 80}{100} + 5 = 9{,}24$$ *мл* экстракта.

4 *мл* этого экстракта нейтрализуются, например, 0,8 *мл* раствора фосфата (1); отсюда в опыт было взято 3,75 *мл*. Общее разведение составляет $\frac{9{,}24}{5} \cdot \frac{4{,}8}{4} \cdot \frac{1}{3{,}75} = 0{,}591$; умножением на 0,591 получают содержание α-кетоглутарата в 1 *мл* крови:

а) для 340 *ммк*:

$$\Delta E \cdot 0{,}309 \cdot 0{,}591 = \Delta E \cdot 0{,}183$$ *мкмолям* α-кетоглутарата в 1 *мл* крови;

$$\Delta E \cdot 0{,}183 \cdot 146 = \Delta E \cdot 26{,}8$$ *мкг* α-кетоглутарата в 1 *мл* крови (146 — мол. вес α-кетоглутаровой кислоты).

б) для 366 *ммк*:

$$\Delta E \cdot 0{,}581 \cdot 0{,}591 = \Delta E \cdot 0{,}345$$ *мкмолям* α-кетоглутарата в 1 *мл* крови;

$$\Delta E \cdot 0{,}345 \cdot 146 = \Delta E \cdot 50$$ *мкг* α-кетоглутарата в 1 *мл* крови.

Пример. В 5 *мл* нормальной крови осаждены белки; было добавлено 0,8 *мл* раствора фосфата (в хлорнокислой надосадочной жидкости) до pH 7,55.

При 366 *ммк* было измерено:

$$E_1 = 0,357;\ E_2 = 0,330;\ E_3 = 0,334;$$

$$E_3 - E_2 = \Delta E_E = 0,004;\ E_2 - E_E = 0,326;$$

$$\Delta E = 0,357 - 0,326 = 0,031;$$

0,031·50,3 = 1,56 *мкг* α-кетоглутарата в 1 *мл* крови, или 0,156 *мг%*.

Нормальные значения в человеческой крови составляют 1,55 *мкг* α-кетоглутарата на 1 *мл* крови.

Источники ошибок. ГДГ катализирует также и восстановленное аминирование α-кетовалериановой кислоты в *L*-норвалин; скорость этой реакции составляет около 25% скорости аминирования α-кетоглутарата; скорость превращения α-кетомасляной и α-кетоизовалериановой кислот составляет лишь 2% скорости реакции α-кетоглутарата. Щавелевоуксусная кислота не реагирует. Пируват реагирует со скоростью, равной приблизительно 0,5% скорости реакции α-кетоглутарата. Ионы аммония в концентрациях больших, чем 3 *ммоля*, в безбелковом нейтрализованном экстракте ингибируют превращение в кетоглутарат, так как они сдвигают равновесие реакции. Мочевина в количестве 2 *ммолей* в экстракте мешает определению. Мочевая и аскорбиновая кислоты, креатинин и креатин не влияют. Точность метода 3%.

Определение фумаровой кислоты [16]

Метод основан на ферментативном превращении фумарата в лактат и CO_2. Анализ заканчивают манометрическим измерением выделившегося CO_2. Детали анализа см. [16].

Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

Определение лимонной кислоты [17]

Принцип. Экстракты A. aerogenes, очищенные от клеток, выращенных с цитратом в качестве источника углерода, содержат цитразу [1], оксалацетатдекарбоксилазу [2] и катализируют реакции:

цитрат ⇄ ацетат + оксалацетат; (1)

оксалацетат ⇄ CO_2 + пируват. (2)

Эта последовательность реакций сочетается с восстановлением пирувата посредством восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (НАД-H_2) и лактатдегидрогеназы:

пируват + НАД - Н + H^+ ⇄ лактат + НАД. (3)

В приведенных ниже условиях при расщеплении 1 *моля* цитрата окисляется точно 1 *моль* НАД-H_2.

[1] КФ 4.1.3.6.
[2] КФ 4.1.1.3.

Реактивы: 1) буферный раствор фосфата калия (0,3*М*, pH 7,4) с $MgSO_4$ (4,8 *ммоля*): 4,333 *г* K_2HPO_4 и 0,698 *г* KH_2PO_4 растворяют примерно в 70 *мл* дистиллированной воды; добавляют 12 *мл* раствора 1,0 *г* $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ в 100 *мл* дистиллированной воды; смесь доливают дистиллированной водой до 100 *мл*; 2) метафосфорная кислота (около 20% в/о раствор): 50 *г* HPO_3 растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 200 *мл*; 3) серная кислота (около 18 н. раствор): 50 *мл* концентрированной H_2SO_4 медленно вливают в 50 *мл* дистиллированной воды; 4) восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (около $5 \cdot 10^{-3}$ *М* раствор НАД-H_2): 25 *мг* НАД-Н-Na_2 растворяют в 5 *мл* дистиллированной воды; 5) раствор едкого натра (5 н.): 100 *г* едкого натра растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 500 *мл*; 6) сульфат магния (около $4 \cdot 10^{-2}$ *М* раствор): 1 *г* $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*; 7) лактатдегидрогеназа, ЛДГ (около 5 *мг* белка на 1 *мл*): взвесь фермента разбавляют 2,1 *М* раствором сульфата аммония приблизительно до 5 *мг/мл*; 8) цитраза и оксалацетатдекарбоксилаза (см. стр. 210) (около 1 *мг* белка на 1 *мл*); свободный от клеток, частично очищенный экстракт A. aerogenes применяют неразведенным.

Раствор НАД-H_2 еженедельно готовят заново и сохраняют при 0° в темноте. Частично очищенные или сырые экстракты A. aerogenes (см. приложение, стр. 210) сохраняют ферментную активность несколько недель при хранении в замороженном состоянии. Их можно оттаивать и снова замораживать через небольшие промежутки времени с незначительной потерей активности.

Техника. *Подготовка исследуемого материала.* В фильтратах культуральных сред, бедных белком, цитрат можно определять без осаждения белков. Высокое содержание белка мешает измерению при 340 *ммк*. В качестве средств осаждения белков не годятся: хлорная кислота (дает лишь 70% цитрата в надосадочной жидкости), сульфат цинка с NaOH или $Ba(OH)_2$ (удаляется с белком почти весь цитрат), трихлоруксусная кислота (ее нельзя полностью удалить, и она мешает действию фермента); метафосфорная кислота пригодна для осаждения белков из сыворотки. Из пробы удаляют сильным катионитом аминокислоты и пептиды, метафосфорной кислотой — белок, кипячением с серной кислотой разрушают β-кетокислоты и переводят метафосфат в ортофосфат (нейтральные растворы метафосфата ингибируют цитразу).

Биологические жидкости примерно со 100 *мкг* цитрата, например 4 *мл* сыворотки, разводят до 20 *мл* водой, 5 мин. помешивают с 1 *г* амберлита *Cg* — 120* и отфильтровывают от ионита. Помешивая, вносят в колбочку 15 *мл* фильтрата, 3 *мл* раствора метафосфорной кислоты (2), через 5 мин. фильтруют. В четыре градуированные пробирки вносят: 3 *мл* фильтрата, 2 маленьких стеклянных шари-

---

* Относительно характеристики свойств и применения зарубежных ионообменных смол см. Г. Осборн. Синтетические ионообменники. М., «Мир», 1964.

ка, 0,1 *мл* раствора серной кислоты (3). Пробирки помещают на масляную баню при 115—120°, содержимое каждой сгущают до 1 *мл*, охлаждают, нейтрализуют 0,75 *мл* раствора едкого натра (5) (pH 7,2—7,6) и дополняют дистиллированной водой до 3 *мл*. В пробирки отмеривают пипеткой: 2 *мл* нейтрализованной пробы, 0,2 *мл* раствора сульфата магния (6), 0,55 *мл* воды. Смешивают и нагревают до 30°. Анализируют 1,75 *мл* этой смеси.

Постановка опыта. Пируват в опыте должен быть определен отдельно в двух освобожденных от белков пробах. При этом вместо раствора цитраза-оксалацетатдекарбоксилаза (8) вносят 0,20 *мл* дистиллированной воды. Изменение экстинкции ΔE_p, появляющееся после добавления ЛДГ, следует учитывать при вычислении.

Измерения ведут при длине волны 340 *ммк*. Толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 3,005 *мл*.

В кварцевую кювету, подогретую на водяной бане до 30°, загружают 1,00 *мл* фосфатного буферного раствора (1), 1,75 *мл* освобожденного от белка исследуемого материала (соответствует 10—80 *мкг* цитрата), 0,20 *мл* смеси цитраза-оксалацетатдекарбоксилаза (8) и оставляют на 30 мин. при 30°, затем добавляют 0,05 *мл* раствора НАД-H_2(4), хорошо смешивают и измеряют начальную экстинкцию E_1 против сравнительной кюветы, наполненной водой. Маленьким стеклянным шпателем вносят в раствор кюветы опыта, размешивая, 0,005 *мл* взвеси ЛДГ(7). Оставляют на 3 мин. при комнатной температуре и измеряют конечное значение экстинкции E_2 при 340 *ммк*: $E_1 - E_2 = \Delta E$.

Для небольшого изменения экстинкции экстрактом A. aerogenes измерение повторяют с 1,75 *мл* воды вместо освобожденной от белка пробы. Обычно уменьшение экстинкции ΔE_e составляет около 0,040 (соответствует 0,02 *мкмоля* цитрата на 3 *мл* опыта). Кроме того, определяют содержание пирувата (E_p) в пробе (см. стр. 221); ΔE_e и ΔE_p входят в вычисление.

Вычисление. Полученное в главном опыте значение ΔE следует поправить:

$$\Delta E_{\text{попр}} = \Delta E - \Delta E_p - \Delta E_e.$$

Между поправленным значением ΔE и концентрацией цитрата при содержании 0—0,3 *мкмоля* цитрата на 3 *мл* опыта (или $\Delta E =$ $= 0$—$0,600$) существует линейное отношение. Поэтому легко может быть построена калибровочная кривая. С другой стороны, коэффициент экстинкции для НАД-H_2 при 340 *ммк* и толщине слоя 1 *см* $\varepsilon_{340} = 6,22 \cdot 10^6$ *см²/моль*, так что 0,1 *мкмоля* цитрата на 3 *мл* опыта соответствует $\Delta E_{1\,см}^{340} = 0,207$.

Для вычисления содержания цитрата в первоначально исследуемом материале результат анализа следует умножить на фактор разведения, обусловленный осаждением белков.

Источники ошибок. НАД-H_2 не окисляется, если вместо цитрата вносят (0,3 *мкмоля* на 3 *мл* опыта): аланин, серин, глицин, фенил-аланин, цистеин, аспарагиновую, глутаминовую, ян-

тарную, яблочную, фумаровую, α-кетоглутаровую или изолимонную кислоты. 0,3 *мкмоля* аконитовой кислоты на 3 *мл* опыта дают незначительную реакцию, соответствующую 0,01 *мкмоля* пирувата.

Каждая из этих кислот (0,3 *мкмоля* на 3 *мл* опыта) была исследована в присутствии цитрата 0,08 *мкмоля* на 3 *мл* опыта. Только глутаминовая и α-кетоглутаровая кислоты мешают определению цитрата; в их присутствии содержание цитрата было найдено слишком низким (на 40 или 20%). Пируват в исследуемом материале также охватывается реакцией ЛДГ. Поэтому его следует определять отдельно. Точность метода 2%.

Приложение. Приготовление экстракта из A. aerogenes (цитраза/оксалацетатдекарбоксилаза).

Реактивы: 1) питательная среда: 9 *г* тринатриевого цитрата $\cdot 3H_2O$, 1 *г* $(NH_4)_2SO_4$, 2 *г* KH_2PO_4, 0,4 *г* $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ растворяют в дистиллированной воде и объем доводят до 1000 *мл*, нейтрализуют, добавляя раствор NaOH, до pH 7; 2) буферный раствор фосфата калия (0,003*M*, pH 7,4) : 4,333 *г* KH_2PO_4 и 0,698 *г* K_2HPO_4 растворяют в дистиллированной воде и объем доводят до 100 *мл*; 3) окись алюминия, гель (11 *мг* сухого вещества на 1 *мл*): 340 *г* $Al(NH_4) \cdot (SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ растворяют в 500 *мл* дистиллированной воды (горячей). Горячий раствор вливают в 3,25 *л* водного раствора, содержащего 100 *г* сульфата аммония и 215 *мл* раствора аммиака (20%, нагретого до 60°); энергично перемешивают и оставляют на 15 мин. при 60°, затем разбавляют дистиллированной водой до 20 *л*, после осаждения осадка жидкость сливают, остаток промывают водой три раза по 20 *л*, к последней промывной воде добавляют 40 *мл* 20%-ного аммиака. Промывают 12—20 раз, пока промывная вода не перестанет быть мутной. Центрифугируют, изготовляют взвесь из осадка в дистиллированной воде до содержания 11 *мг* сухого вещества в 1 *мл*.

Культура бактерий A. aerogenes *N — CTC* 418. Культуры выращивают без аэрации при 30 или 37° в 10-литровых бутылях, наполненных до горлышка питательной средой, в течение суток. В качестве инокулята служит культура, которая достигла своего полного роста в 25 *мл* питательной среды. При помощи суперцентрифуги из 10 *л* взвеси клеток получают около 12 *г* биомассы. Клетки разрушают без добавления растирающего средства на прессе для бактерий, предварительно охлажденном до —14°. Экстрагируют буферным раствором фосфата калия (2) и центрифугируют при 12 000 *об/мин* в течение часа. Можно также суспензировать 2,5 *г* клеточной пасты в 10 *мл* фосфатного буферного раствора, 5 мин. взбалтывать и центрифугировать. В обоих случаях прозрачная надосадочная жидкость содержит около 0,5% белка и сохраняется в замороженном состоянии. Сырые экстракты содержат НАД-H_2-оксидазу, которая должна быть удалена. 10 *мл* экстракта наливают в диализатор и 5 мин. раскачивают при 50±0,5° в 800 *мл* дистиллированной воды. Содержимое трубки охлаждают ледяной водой и вносят в нее 10 *мл* геля окиси алюминия (3). Взвесь центрифугируют при 0°

при 12 000 *об/мин*. Прозрачная надосадочная жидкость содержит 0,1% белка (цитразу и оксалацетатдекарбоксилазу).

Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

Определение лимонной и изолимонной кислот [18]

Принцип. Изоцитратдегидрогеназа (ИДГ)[1] катализирует дегидрирование и декарбоксилирование изоцитрата (α-D_s-β-L-изоцитрат) никотинамидадениндинуклеотидфосфатом(НАДФ):

$$\text{изоцитрат} + \text{НАДФ}^+ \rightleftarrows \alpha\text{-кетоглутарат} + CO_2 + \text{НАДФ-Н} + H^+ \qquad (1)$$

Равновесие лежит далеко с правой стороны. Константа равновесия K равна: для дегидрирования изоцитрата — 3,3 *моль/л*, для декарбоксилирования оксалсукцината — $2{,}5 \cdot 10^3$ *моль/л*, для совокупной реакции — $7{,}7 \cdot 10^3$ (*моль/л*)^2.

Аконитаза[2] катализирует превращение цитрата в изоцитрат:

$$\text{цитрат} \rightleftarrows \text{цис-аконитат} \rightleftarrows \text{изоцитрат} \qquad (2)$$

Равновесие имеется для 91% цитрата, 3% цис-аконитата и 6% изоцитрата. При достаточной активности изоцитратдегидрогеназы весь цитрат переводится, согласно балансовому уравнению, в α-кетоглутарат:

$$\text{цитрат} + \text{НАДФ}^+ \xrightleftharpoons[\text{ИДГ } (Mn^{2+})]{\text{аконитаза } (Fe^{2+})} \alpha\text{-кетоглутарат} + CO_2 + \text{НАДФ-Н} + H^+ \qquad (3)$$

Реактивы: 1) трис-буферный раствор (0,1 *М*, pH 7,4): 6,043 *г* трис-оксиметиламинометана растворяют в 100 *мл* бидистиллированной воды, к раствору добавляют 0,186 *г* ЭДТА-$Na_2H_2 \cdot 2H_2O$ и посредством 2 н. соляной кислоты устанавливают pH 7,4 (стеклянный электрод) и дополняют бидистиллированной водой до 500 *мл*; 2) сульфат марганца (0,02 *М* раствор): 67,6 *мг* $MnSO_4 \cdot H_2O$ или 74,8 *мг* $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ растворяют в бидистиллированной воде и доводят объем до 20 *мл*; 3) никотинамидадениндинуклеотидфосфат (около $5 \cdot 10^{-3}$*М* раствор НАДФ): 12 *мг* НАДФ-NaH_2 растворяют в 3 *мл* трис-буферного раствора (1); 4) тартрат калия-натрия (0,3*М* раствор, pH 7,4): 8,467 *г* $KNa\ C_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$ растворяют в 50 *мл* бидистиллированной воды, устанавливают pH 7,4 1 н. раствором едкого кали (стеклянный электрод) и доводят бидистиллированной водой до 100 *мл*; 5) железоаммиачные квасцы (10^{-3} *М* раствор): 7,84 *мг* $Fe(NH_4)(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ растворяют в бидистиллированной воде и доводят объем до 20 *мл*. Раствор приготовляется ежедневно: 6) цис-

---

[1] КФ 1.1.1.41.
[2] КФ 4.2.1.3.

теин ($5 \cdot 10^{-2}$ *М* раствор, pH 7,4): 17,6 *г* цистеингидрохлорид · H_2O растворяют в 1 *мл* бидистиллированной воды, охлаждают на ледяной бане, устанавливают 1 н. раствором едкого натра pH до 7,4 (индикаторная бумага), доливают бидистиллированной водой до 2 *мл*; раствор готовят за 10 мин. до употребления; 7) стандартный раствор изоцитрата: а) основной раствор (0,05 *М* *D*-изоцитрата, pH 7,4): 435 *мг* α-изолимонной кислоты растворяют в 10 *мл* бидистиллированной воды, устанавливают pH 1 н. раствором едкого кали равным 9 (индикаторная бумага), ставят раствор на 10 мин. в кипящую водяную баню, удерживая при этом pH не выше 7; охлаждают, доводят pH 2 н. раствором соляной кислоты до 7,4, дополняют бидистиллированной водой до 25 *мл*; б) рабочий раствор ($5 \cdot 10^{-4}$ *М* *D*-изоцитрата): 1 *мл* раствора *а* до употребления разводят бидистиллированной водой до 100 *мл*; 8) стандартный раствор цитрата: а) основной раствор (0,1 *М*, pH 7,4): 4,202 *г* лимонной кислоты (моногидрат) растворяют в бидистиллированной воде и объем доводят до 100 *мл*; раствор должен быть 0,20 *М* (0,60 н.), что проверяют титрованием (точно 0,50 н. раствором едкого натра), 50 *мл* этого раствора доводят 1 н. раствором едкого натра до pH 7,4 (стеклянный электрод), доливают дистиллированной водой до 100 *мл*; б) рабочий раствор ($2 \cdot 10^{-3}$ *М*): 1 *мл* раствора *а* (перед употреблением) доливают бидистиллированной водой до 50 *мл*; 9) изоцитратдегидрогеназа, ИДГ[1] (около 800 *ед/мл*); растворы, изготовленные по методу Дикмена и Клутье, применяют неразведенными; старые растворы активируют непосредственно перед употреблением: 1 объем раствора фермента соединяют при 0° с $^1/_{20}$ объема раствора железа и $^1/_{10}$ объема раствора цистеина, если требуется pH снова установить на 7,4, и оставляют стоять на 1 час при 0°.

Растворы цистеина, сульфата аммония — железа и ИДГ готовят ежедневно свежими. Активированный раствор аконитазы[2] пригоден к употреблению после отстаивания в течение 1 часа при 0° лишь 2 часа. Все остальные растворы сохраняются при 0—4° в течение нескольких недель, при глубоком охлаждении практически неограниченное время. Активирование аконитазы см. стр. 214.

Техника. *Подготовка исследуемого материала.* Цитрат и изоцитрат относительно стабильны и обычно не разрушаются при получении экстрактов из биологического материала. Глютатион (GSH и GS-SG) должен быть удален из исследуемого материала, так как оба ферментных препарата содержат глютатионредуктазу[3]. Исследуемый экстракт обрабатывают катионитом, например амберлитом IR-120.

---

[1] КФ 1.1.1.41.
[2] КФ 4.2.1.3.
[3] КФ 1.6.4.2.

Определение изоцитрата

Анализируемая проба должна содержать столько изоцитрата, чтобы было достигнуто изменение экстинкции, приблизительно равное 0,1. Биологический материал содержит очень немного изоцитрата. Возможно, что объем раствора пробы (0,1 *мл*), который берут для постановки опыта, будет недостаточным. В таком случае вместо дистиллированной воды можно добавить еще раствор пробы. Если и этого количества окажется недостаточно, то буферный раствор изготовляют в четырехкратной концентрации, благодаря чему в распоряжении будет еще 0,75 *мл* для раствора пробы.

Измерение ведут при длине волны 366 *ммк*. Толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 1,65 *мл*; температура комнатная; измерение ведут против воздуха.

В кювету отмеривают пипеткой: 1 *мл* трис-буферного раствора (1), 0,2 *мл* раствора Mn^{2+} (2), 0,05 *мл* раствора НАДФ (3), 0,01—0,02 *мл* (около 12 ед.) раствора ИДГ (9), бидистиллированной воды до 1,55 *мл* и основательно смешивают. После установления постоянной экстинкции (3 мин.) измеряют ее значение E_1.

Реакцию начинают добавлением (при помешивании) 0,1 *мл* пробы или стандартного раствора. По окончании реакции (1 мин.) измеряют экстинкцию E_2. Ее значение после окончания реакции уменьшается самое большее на 1% за каждые 5 мин.

Вычисление. Начальную экстинкцию E_1 следует поправить на разведение вследствие добавления раствора пробы (фактор: 1,55/1,65):

$$\Delta E = E_2 - \frac{1{,}55}{1{,}65} E_1 = 2000$$ соответствует 1 *мкмолю* изоцитрата в опыте.

Таким образом, получают:

$$\frac{E_2 - 0{,}94E_1}{2}$$ *мкмолей* изоцитрата в опыте.

Определение цитрата

При исследовании биологического материала описанным здесь методом находят сумму цитрат-аконитат-изоцитрат. Если в исследуемом материале было установлено равновесие, катализированное аконитазой, то это обусловливает ошибку максимально в 9,1%. Чтобы получить подлинное содержание цитрата, определяют отдельно изоцитрат, имеющийся в исследуемом материале (см. выше), и вычитают его значение из результата определения цитрата.

Поправка для цис-аконитата возможна лишь математически (см. на стр. 211 данные о концентрации цис-аконитата в реакции 2), однако неизвестно, постоянно ли катализированное аконитазой (см. стр. 214) равновесие в живой ткани.

При анализе экстрактов печени получают заниженные результаты (причина пока еще не выяснена).

Измерение ведут при длине волны 366 *ммк*. Толщина слоя 1 *см*; объем анализируемой жидкости 1,65 *мл*; температура комнатная, измерение ведут против воздуха.

В кювету отмеривают пипеткой: 0,8 *мл* трис-буферного раствора (1), 0,1 *мл* раствора Mn^{2+} (2), 0,05 *мл* (около 40 ед.) раствора ИДГ (9), 0,1 *мл* раствора тартрата (4), 0,1—0,2 *мл* (16—25 ед.) раствора аконитазы (10), бидистиллированной воды до 1,57 *мл* и основательно смешивают. После установления постоянной экстинкции (2 мин.) вносят, помешивая, 0,05 *мл* пробы или стандартного раствора (8, б), измеряют экстинкцию E_1; реакцию начинают внесением при помешивании 0,03 *мл* раствора НАДФ (3). После окончания реакции измеряют экстинкцию E_2. Ее значение после окончания реакции понижается самое большее на 1% за каждые 5 мин.

Вычисление. Начальная экстинкция должна быть поправлена на разведение при добавлении раствора НАДФ (фактор: 1,55/1,65)

$\Delta E = E_2 - \frac{1,55}{1,65} \cdot E_1$=2000 соответствует (см. [18]) 1 *мкмолю* нитрата в опыте, таким образом:

$\frac{E_2 - 0,98E_1}{2}$ *мкмолям* цитрата в опыте (см. предварительное замечание к постановке опыта для цитрата на стр. 213).

Источники ошибок. 1. Раствор ИДГ содержит следы ферментов: «малатного» и аконитазы. Тем не менее *L*-малат в 100-кратном молярном избытке и цитрат в 200-кратном молярном избытке не мешают определению изоцитрата.

2. При определении цитрата *L*-малат может быть в 10-кратном, а глюкозо-5-фосфат в 50-кратном молярном избытке. Поэтому при исследовании биологического материала можно не считаться с тем, что *L*-малат и (или) глюкозо-5-фосфат имеются более чем в 5-кратном молярном избытке.

3. Тканевые экстракты содержат глютатион, окисленная форма которого реагирует с глютатионредуктазой (см. стр. 212), имеющейся в обоих препаратах фермента, как только достигается достаточная концентрация НАДФ. Помехи, вызванные глютатионом, узнают по сильному «обратному сдвигу» экстинкции. Во избежание этого глютатион удаляют пропусканием через колонку с амберлитом *IR* - 120 (или соответственно с другим ионитом).

4. Активирование аконитазы (см. стр. 212) цистеином и Fe^{2+} может привести к некоторым осложнениям: а) цистеин и Fe^{2+} реагируют при доступе кислорода, образуя сильно окрашенный комплекс; тартрат, добавленный к опыту, мешает этому образованию; при определении активности аконитазы достаточна концентрация цитрата, имеющаяся в опыте, чтобы уловить двухвалентное железо; б) тартрат ингибирует аконитазу (0,1 *M* тартрата ингибирует до 20%); в) цистеин образует с НАДФ сильно поглощающий комплекс. Чтобы избежать источников ошибок *б* и *в* (см. выше), концентрации цистеина и Fe^{2+} применяют на 50 или 90% меньше, чем первона-

чально было рекомендовано авторами при активировании аконитазы. Кроме того, не следует увеличивать количество НАДФ в опыте с определением цитрата. ИДГ и аконитаза не реагируют, кроме изоцитрата, цитрата и цис-аконитата, ни с одним из встречающихся в биологическом материале веществ. Точность метода около 5%. Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

Определение оротовой кислоты [19]

Принцип. Дегидрогеназа дегидрооротовой кислоты из Zymobacterium oroticum катализирует восстановление оротовой кислоты восстановленным никотинамидадениндинуклеотидом ($НАД\text{-}H_2$):

$$\text{Оротат} + \text{НАД-Н} + H^+ \rightleftarrows \text{дегидрооротат} + \text{НАД}^+ \qquad (1)$$

Равновесие сдвинуто в сторону образования дегидрооротовой кислоты; константа равновесия $K = 2,4 \cdot 10^9$. Число оборотов (превращений) фермента, отнесенное к содержанию в нем флавина, составляет около 1200. Восстановление оротовой кислоты при pH 6,5 имеет довольно резкий максимум скорости. С избыточным $НАД\text{-}H_2$ реакция протекает достаточно быстро, оротовая кислота восстанавливается почти количественно. В аэробных условиях, однако, окисляется больше $НАД\text{-}H_2$, чем это соответствует содержанию оротовой кислоты в исследуемом материале. Поэтому восстановление оротовой кислоты определяют прямо по исчезновению поглощения при 282 *ммк*.

Так как при проведении реакции должен быть добавлен цистеин, который медленно окисляется (что ведет к увеличению абсорбции при 282 *ммк*), то следует установить контрольную кювету, содержащую все реактивы, за исключением дегидрогеназы дегидрооротовой кислоты. Когда экстинкция кюветы опыта начинает увеличиваться так же быстро, как и экстинкция контрольной кюветы, это значит, что ферментативная реакция закончилась.

Реактивы: 1) фосфатный буферный раствор (0,02 *М*; pH 5,8): 92 *мл* 0,2 *М* раствора NaH_2PO_4 (2,76 *г* $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ в 100 *мл* водного раствора) смешивают с 8 *мл* 0,2 *М* раствора Na_2HPO_4 (3,56 *г* $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ в 100 *мл* водного раствора); 2) фосфатный буферный раствор (1 *М*, pH 6,2): 81,5 *мл* 1 *М* раствора NaH_2PO_4 (13,8 *г* $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ в 100 *мл* водного раствора) смешивают с 18,5 *мл* 1 *М* раствора Na_2HPO_4 (17,8 *г* $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ в 100 *мл* водного раствора); 3) цистеин хлористоводородный (0,1 *М* раствор): 79 *мг* цистеингидрохлорида растворяют в 5 *мл* дистиллированной воды непосредственно перед употреблением; 4) оротат натрия (около 0,02 *М*): к взвеси 0,312 *г* оротовой кислоты в небольшом количестве дистиллированной воды добавляют 4 *мл* 1 н. раствора NaOH и разводят дистиллированной водой до 100 *мл*; 5) восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (около 0,003 *М* раствор $НАД\text{-}H_2$): 8,4 *мг*

НАД-Н-Na_2 растворяют в 3 *мл* дистиллированной воды; 6) дегидрогеназа дигидрооротовой кислоты: кристаллический фермент экстрагируют ледяным 0,2 *М* фосфатным буферным раствором (1), экстракт освобождают от плохо растворимого белого вещества центрифугированием, надосадочную жидкость разводят холодным 0,2*М* фосфатным буферным раствором (1) настолько, чтобы в опытной смеси для стандартизации фермента экстинкция за 3 мин. уменьшалась бы приблизительно на 0,2 (см. ниже «Техника»).

Растворы 1 и 2 хранят при комнатной температуре, 4 и 6 — при 4°, а 5 — при —15°, раствор 3 изготовляют только непосредственно перед употреблением. Разведенный раствор фермента (6) при температуре выше 20° быстро теряет свою активность.

Т е х н и к а. Приведенная здесь пропись для определения оротовой кислоты была опробована только на чистых растворах оротата натрия. Очевидно, этим методом можно определять оротовую кислоту и в экстрактах тканей после очистки, например после хроматографического разделения на бумаге, на Дауэкс-50 или Дауэкс-2. Сначала стандартизируют препарат фермента. Для этого измерение ведут при длине волны 340 *ммк*. Толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 3 *мл*; измерения ведут против сравнительной кюветы с дистиллированной водой. Растворы отмеривают пипеткой в указанной последовательности: 0,4 *мл* буферного раствора (2), 0,2 *мл* раствора цистеина (3), 0,3 *мл* раствора оротата (4), 1,0 *мл* дистиллированной воды. Добавляют 0,5 *мл* раствора фермента (6) и дистиллированной воды до 2,9 *мл*, смешивают, дают постоять 10 мин. при 20°, затем приливают 0,1 *мл* раствора НАД-H_2 (5), перемешивают и как можно скорее измеряют экстинкцию с промежутками в 30 сек. Количество фермента, которое дает в течение 3 мин. уменьшение экстинкции около 0,2, применяют для постановки опыта.

Постановка опыта. Измерение ведут при длине волны 282 *ммк*; толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 3 *мл*; измерение ведут против сравнительной кюветы с дистиллированной водой. Следует обратить особое внимание на то, чтобы кювета опыта и контрольная кювета получали бы постоянно точно одинаковые объемы растворов оротата, цистеина и, позднее, НАД-H_2.

Растворы отмеривают пипеткой в указанной последовательности:

Кювета с опытной смесью	Контрольная кювета
0,4 *мл* буферного раствора (2)	0,4 *мл* буферного раствора (2)
0,2 *мл* раствора цистеина (3)	0,2 *мл* раствора цистеина (3)
Раствор пробы (содержащий 0,03—0,12 *мкмоля* оротата)	Раствор пробы (как в кювете опыта)
1 *мл* дистиллированой воды	Дистиллированной воды — до 2,9 *мл*
Раствор фермента (6) соответственной стандартизации (0,5 *мл*)	
Дистиллированной воды — до 2,9 *мл*	

Содержимое кювет перемешивают, дают постоять 10 мин. при 20°, затем в кювету с опытом и в контрольную вносят по 0,1 *мл* раствора НАД-H_2 (5), перемешивают и измеряют экстинкцию с промежутками в 30 сек. или 1 мин., пока экстинкция кюветы опыта не начинает повышаться так же быстро, как экстинкция контрольной кюветы. Реакция заканчивается за 10—15 мин.

Вместо того чтобы измерять экстинкции кюветы опыта и контрольной в отдельности против воды, можно измерять также экстинкцию контрольной кюветы против экстинкции кюветы с опытной смесью. Когда экстинкция достигнет постоянного значения, это значит, что реакция окончилась.

Вычисление. В условиях описанного здесь опыта оротовая кислота обладает при длине волны 282 *ммк* коэффициентом экстинкции $E_{282} = 7{,}5$ *см²/мкмоль*.

Изменение экстинкции в течение опыта следует умножить на 0,4, чтобы получить содержание оротовой кислоты в смеси опыта в *мкмолях* оротата (3 *мл*); если ведут измерение в кювете с опытной смесью и контрольной кювете в отдельности против воды, то в качестве изменения экстинкции следует ввести разницу от вычитания: конечная экстинкция контрольной кюветы минус конечная экстинкция кюветы опыта. Экстинкция фермента, содержащегося в кювете опыта, при 282 *ммк* не учитывается.

При анализе опытных смесей с 0,04; 0,08 и 0,12 *мкмоля* оротовой кислоты измерения изменения экстинкции составляют, соответственно, 92 ± 1%; 95 ± 1% или 96 ± 1% вычисленной величины. 0,03 *мкмоля* оротовой кислоты дают 91% ожидаемого изменения экстинкции. Граница чувствительности метода лежит у 0,008 *мкмоля* на 3 *мл* смеси опыта.

Источники ошибок. Кроме оротата дегидрогеназа дигидрооротовой кислоты и НАД-H_2 восстанавливают также 5-фтор-оротат. 5-фтор-оротат имеет ту же константу Михаэлиса (около $1{,}3 \cdot 10^{-4}$ *М*). Максимальная скорость его восстановления больше. Другие пиримидиновые субстраты неизвестны. Урацил, цитозин, 5-метил-цитозин и тимин не действуют ни в качестве субстратов, ни в качестве ингибиторов. $2 \cdot 10^{-3}$ *М* S-метил-оротат ингибирует реакцию восстановления оротовой кислоты приблизительно на 50%. 0,2 *М* хлористый натрий и 0,2 *М* фосфат натрия ингибируют (pH 6,5) на 55 или 20%. Точность метода 6%.

Получение дегидрогеназы дигидрооротовой кислоты [20]

Фермент получают в виде флавоглобулина из бесклеточных экстрактов Z. oroticum. Очистка включает следующие приемы: повторная обработка протамин-сульфатом для удаления нуклеиновых кислот, фракционирование сульфатом аммония и осаждение посредством диализа. Лишенный нуклеиновой кислоты фермент кристаллизуется из 0,2 *М* раствора NaH_2PO_4 в форме тонких тупых оранжево-желтых игл. Он содержит по 1 *молю*

ФМН и ФАД. Желтый цвет быстро и почти полностью исчезает при обработке избыточным НАД-H_2 или дитионитом. Он исчезает менее быстро и менее полно при обработке избыточной дигидрооротовой кислотой, причем должен присутствовать цистеин и отсутствовать кислород. Для максимальной активности необходима предварительная инкубация фермента с цистеином. Детали см. [20].

Розенблоом и Зигмиллер [20а] предложили ферментативный метод определения оротовой кислоты. Метод основан на ферментативном превращении оротовой кислоты в уридиловую при помощи оротидилатпирсфосфорилазы и оротидилатдекарбоксилазы, полученных из пекарских дрожжей фракционированием $(NH_4)_2SO_4$. Количество уридиловой кислоты определяют по изменению оптической плотности при 295 *ммк*.

Чувствительность метода — 1 *мкг* оротовой кислоты в 1 *мл*. При помощи предложенного метода показано, что в сыворотке крови и в моче здоровых людей оротовая кислота в обнаруживаемых количествах отсутствует. Детали анализа см. [20а].

Определение гиалуроновой кислоты

Спектрофотометрический метод [21]

Принцип. При разрушении гиалуроновой кислоты бактериальной гиалуронидазой образуется (почти количественно) дисахарид, который был идентифицирован как 4,5-ненасыщенный уронид *D*-Δ-глюкозо-пиранозид-уроновая кислота-β-(1—3)-2-ацетамин-2-дезокси-*D*-глюкоза. Он, как и его гомологичные олигосахариды, обладает максимумом абсорбции при 230 *ммк*. Абсорбция гиалуроновой кислоты при этой длине волны незначительна.

Реактивы (для 20 анализов): 1) фосфатный буферный раствор (*M*/15, pH 6,4): в мерную колбу емкостью 250 *мл* отмеривают 66 *мл* раствора динатриевого фосфата (11,876 *г/л*), доливают до метки раствором монокалиевого фосфата (9,078 *г/л*); 2) хлорид натрия (0,15 *M* раствор: 0,9 *г* хлористого натрия растворяют в воде и доливают до 100 *мл*); 3) хлорная кислота (около 20% в/о раствор): около 13 *мл* $HClO_4$ (плотность 1,67) разводят водой до 75 *мл*; 4) гиалуронидаза бактерий (около 1 *мг* белка в 1 *мл*): 7 *мг* сухого препарата растворяют в 7 *мл* 0,15 *M* раствора хлорида натрия; 5) гиалуронат калия (200 *мкг* в 1 *мл*): 20 *мг* гиалуроната калия растворяют в 100 *мл* фосфатного буферного раствора (1).

Растворы сохраняются в закупоренных склянках в холодильнике при 0—4°. Раствор гиалуронидазы сохраняется в этих условиях в течение трех месяцев без значительной потери активности. Остальные растворы сохраняются неограниченное время, если не происходит роста бактерий.

Техника. *Подготовка исследуемого материала.* Жидкую пробу можно анализировать немедленно, сухое вещество растворяют в растворе хлорида натрия (2) или готовят взвесь в этом же

растворе. Безбелковые растворы получают так, как это описано ниже.

Постановка опыта. В конические центрифужные пробирки отмеривают растворы главного опыта и калибровочных проб: 1) 2,0 *мл* буферного раствора (1), 0,5 *мл* исследуемого материала, 0,5 *мл* раствора хлорида натрия (2); 2) 1,5 *мл* буферного раствора (1), 0,5 *мл* раствора гиалуроната калия (5), 0,5 *мл* исследуемого материала, 0,5 *мл* хлорида натрия (2); 3) 1,0 *мл* буферного раствора (1), 1,0 *мл* раствора гиалуроната калия (5), 0,5 *мл* исследуемого материала, 0,5 *мл* раствора хлорида натрия (2).

Сравнительный опыт. 4) 2,0 *мл* буферного раствора (1), 0,5 *мл* исследуемого материала, 0,6 *мл* раствора хлорида натрия (2).

Все растворы нагревают в течение 10 мин. до 70°. Если исследуемый материал не содержит белка, то предварительной подготовки материала проводить не надо.

Растворы 1—3 после охлаждения смешивают с 0,61 *мл* бактериальной гиалуронидазы (см. стр. 218) (4). Вслед за этим все пробы инкубируют в течение 6 час. при 37° (водяная баня).

После 6-часовой инкубации к пробам 1—4 добавляют по 0,5 *мл* раствора хлорной кислоты (3), основательно смешивают и центрифугируют 20 мин. при 5000 *g*. Надосадочную жидкость сливают в кварцевые кюветы. Экстинкции измеряют при 230 *ммк* против сравнительного опыта 4.

E_1, E_2 и E_3 являются экстинкциями проб 1—3, E_2 и E_3 представляют калибровочные значения.

Вычисление. Для количеств от 20 до 700 *мкг* гиалуроната калия соблюдается закон Бэра. Для вычисления E_1 относят к экстинкции, найденной для 100 *мкг* гиалуроната калия. Она составляет $E_2 - E_1$ или $E_3 - E_2$ или $E_3 - E_1/2$.

Таким образом, ее среднее значение:

$$E_{100\,мкг} = \frac{(E_3 - E_1) + (E_3 - E_2)}{2}.$$

Содержание гиалуроновой кислоты в 1 *мл* исследуемого материала получают из

$$\frac{E_1 \cdot 100 \cdot 2}{E_{100\,мкг}} = мкг \text{ гиалуроната калия в 1 мл исследуемого материала.}$$

Пример. Исследуемый материал: 0,5 *мл* сыворотки. После инкубации и осаждения белков измерение ведут на волне 230 *ммк* против сравнительной кюветы 4.

$$E_1 = 0{,}250;\ E_2 = 0{,}470;\ E_3 = 0{,}700;\ (E_2 - E_1) = 0{,}220;$$

$$(E_3 - E_2) = 0{,}230;\ E_{100\,мкг} = \frac{(0{,}220 + 0{,}230)}{2} = 0{,}225.$$

$$\frac{0{,}250 \cdot 100}{0{,}255} = 111 \text{ мкг гиалуроната калия в 0,5 мл асцитной сыворотки.}$$

Источники ошибок. Соединения, которые поглощают при длине волны 230 *ммк* и не осаждаются хлорной кислотой, например нуклеотиды (в больших концентрациях), мешают определению. α-гепарин и хондроитинсерные кислоты А и В конкурентно ингибируют бактериальную гиалуронидазу. В присутствии больших количеств этих веществ ферментативному определению должно предшествовать отделение гиалуроновой кислоты. α-гепарин, хондроитинсерные кислоты А и В не разрушаются гиалуронидазой бактерий.

Хондроитин расщепляется лишь в небольшой степени. Кроме того, оптимум pH расщепления хондроитина лежит в кислотной области (pH 5,7). Примеси хондроитина до 30% не мешают анализу гиалуроновой кислоты. До сих пор хондроитин был найден только в роговице. Точность метода 3%.

Колориметрический метод

Принцип. Бактериальная гиалуронидаза (стр. 227 [22]) расщепляет гиалуроновую кислоту количественно с образованием ненасыщенного дисахарида. Образующиеся при этом конечные N-ацетилглюкозаминовые группы при нагревании в щелочи превращаются в производные фурана, которые дают с *п*-диметиламинобензальдегидом красную окраску, пригодную для колориметрирования (реакции Моргана-Элсона). Детали метода см. [22].

Определение полиненасыщенных жирных кислот [23]

Принцип. Липоксидаза катализирует реакцию между растворенным кислородом воздуха и цис-полиненасыщенными кислотами с образованием конъюгированных диэн-гидроперекисей жирных кислот:

$$\text{2-линолат} + 2O_2 \rightarrow \text{9-гидроперокси-октадека-10,12-диэнат} + \text{13-гидроперокси-октадека-9,11-диэнат.} \quad (1)$$

Адсорбция конъюгированных диэн-гидроперекисей при 234 *ммк* служит в качестве меры для определения общего количества всех полиненасыщенных жирных кислот, двойные связи которых отделены друг от друга цис-метиленовыми группами. Она следует закону Ламберта — Бэра в пределах 5 и 25 *мкг* субстрата.

Реактивы: 1) боратный буферный раствор (1 *М*; pH 9,0): 1,9 *г* борной кислоты и 25,0 *г* едкого калия растворяют приблизительно в 800 *мл* дистиллированной воды при помешивании и нагревании на паровой бане. Прозрачный раствор охлаждают до комнатной температуры; 1 н. раствором HCl или 1 н. раствором KOH доводят pH до 9,0, доливают дистиллированной водой до 1000 *мл*; 2) обоche боратный буферный раствор (0,2 *М*; pH 9,0): 200 *мл* раствора (1) доливают дистиллированной водой до 1000 *мл*; 3) липоксидаза (запасный раствор, 1 *мг* белка на 1 *мл*): 10 *мг* липоксидазы растворяют

в 10 *мл* ледяного буферного раствора (2); 4) липоксидаза (разведенный раствор, 0,2 *мг* белка на 1 *мл*): 20 *мл* раствора (3) смешивают с 8,0 *мл* ледяного буферного раствора (2); 5) 5,0 *мл* раствора (4) отмеривают пипеткой в пробирку так, что ее стенка выше уровня жидкости остается сухой.

Пробирку 5 мин. держат в кипящей водяной бане так, чтобы она нагревалась еще на 1 *см* выше уровня раствора фермента. При этих условиях фермент полностью инактивируется; 6) соляная кислота (0,5 н. раствор): 50 *мл* концентрированной соляной кислоты доливают дистиллированной водой до 1000 *мл*; 7) раствор едкого калия (10 н.): 65 *г* едкого калия растворяют в 80 *мл* воды, охлаждают и доливают до 100 *мл*; 8) спиртовой раствор едкого калия (0,5 н.): 0,5 *мл* 10 н. раствора едкого калия (7) смешивают с 9,5 *мл* этанола. Ежедневно готовят свежим; 9) спиртовой раствор едкого калия (1,5 н.): 1,5 *мл* 10 н. раствора едкого калия (7) смешивают с 8,5 *мл* этанола. Ежедневно готовят свежим.

Растворы фермента можно сохранять замороженными в течение нескольких месяцев без потери ими активности. Для оттаивания их ставят в воду при комнатной температуре, после оттаивания их хорошо смешивают и тотчас помещают в баню из ледяной воды. Повторное замораживание и оттаивание не наносит вреда ферментативной активности. Все растворы, содержащие полиненасыщенные жирные кислоты, следует защищать от кислорода воздуха, за исключением времени проведения ферментативной реакции, для которой кислород воздуха необходим. При хранении воздух над растворами вытесняют азотом и сосуды закупоривают.

Для того чтобы испытать раствор фермента (4), готовят раствор жирных кислот из семян хлопка, кукурузного масла или масла бобов сои. Две сантиметровые кварцевые кюветы наполняются по 3 *мл* каждая этим раствором. В первую кювету вносят 0,1 *мл* кипяченого разведенного раствора фермента (5), ставят кювету под световой луч спектрофотометра и устанавливают экстинкцию при длине волны 234 *ммк* равной 0. Во вторую кювету вносят 0,1 *мл* разведенного раствора фермента (4), перемешивают и помещают эту кювету под световым лучом. Экстинкцию измеряют с промежутками в 1 мин. Она должна достигнуть максимума меньше чем за 5 мин. Если этого не происходит, то растворы 4—5 следует вводить более концентрированными или ввести более активный препарат липоксидазы.

Т е х н и к а. *Подготовка исследуемого материала.* В качестве исследуемого материала служит раствор, содержащий 5—25 *мкг* свободной полиненасыщенной кислоты в 3 *мл* боратного буферного раствора (2). Свободные жирные кислоты смешивают с 0,6 *мл* 1 *М* боратного буферного раствора (1) и доливают водой до 3 *мл*. Сложные эфиры жирной кислоты следует омылить: сложный эфир жирной кислоты, масло, жир и гидрированное растительное масло в количестве, соответствующем около 0,5 *мг* полиненасыщенных жирных кислот, смешивают в мерной колбе емкостью 100 *мл* с 1 *мл*

0,5 н. спиртового раствора едкого калия (8) и оставляют стоять в темноте по меньшей мере 4 часа. Затем добавляют 20 *мл* 1 *М* буферного раствора (1), 1 *мл* 0,5 н. раствора HCl (6) и доливают дистиллированной водой до 100 *мл*.

Плазма крови. 0,1 *мл* омыляют, как описано выше, для жирных кислот, но только в 25-миллилитровой колбе (мерной), добавляют 5 *мл* 1 *М* буферного раствора (1), а также 1 *мл* 0,5 н. раствора HCl (6) и доливают дистиллированной водой до 25 *мл*. Ввиду высокой абсорбции контрольной кюветы при длине волны 234 *ммк* экстинкцию измеряют при длине волны 245 *ммк* и применяют для вычисления фактор 5460 вместо 3964.

Микроорганизмы. 100 *мг* высушенного мицелия, смешанного с 2 *мл* 1,5 н. спиртового раствора едкого калия (9), оставляют в покое в 100-миллилитровой измерительной колбе 24 часа при комнатной температуре. Затем добавляют 20 *мл* 1,0 *М* буферного раствора (1), 6 *мл* 0,5 н. раствора HCl (6) и доливают водой до 100 *мл*. Фильтруют через сухую фильтровальную бумагу; аликвоту фильтрата разводят в 10 раз 0,2 *М* буферным раствором (2).

Постановка опыта. Измерение ведут при длине волны 234 *ммк*. Толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 3,1 *мл*. В две пробирки вносят по 3,0 *мл* исследуемого материала; в первую пробирку (контрольный опыт) добавляют 0,10 *мл* прокипяченного разведенного раствора фермента (5) и смешивают. Во вторую пробирку (смесь опыта) вносят 0,10 *мл* разведенного раствора фермента (4) и смешивают. Обе пробирки оставляют стоять 30 мин. при комнатной температуре с доступом воздуха, после чего наливают в кварцевые кюветы, толщина слоя 1 *см*. Спектрофотометр с контрольной кюветой при длине волны 234 *ммк* устанавливают на нуле и измеряют экстинкцию *E* кюветы опыта.

Вычисление. По экстинкции *E* вычисляют *мкг*-процентное содержание полиненасыщенных кислот в аликвоте исследуемого материала по формуле: *мкг* полиненасыщенных жирных кислот $= \frac{E \cdot 3964}{W}$, где *W* — концентрация стандартного раствора в *мкг*, фактор 3964 получается из:

$$\frac{3,1}{3,0} \cdot \frac{1000}{78,2} \cdot 100 \cdot 3 = 3964,$$

$\frac{3,1}{3,0}$ — фактор разведения (3 *мл* раствора исследуемого материала + + 0,1 *мл* раствора фермента).

78,2 — коэффициент экстинкции после реакции с 1 *г* полиненасыщенной кислоты на 1 *л* при толщине слоя 1 *см* и длине волны 234 *ммк*.

1000 — фактор перечисления с *г/л* на *мкг/мл*; 100 — фактор перечисления на %; 3 — объем пробы (*мл*).

Источники ошибок. 1. Загрязнения сравнительного раствора или кипяченого разведенного раствора фермента (5) примесью активного фермента (в растворах 3 и 4) приводят к окисле-

нию полиненасыщенных жирных кислот и в сравнительном растворе, что влечет за собой соответствующее увеличение экстинкции.

2. Следует избегать крайних значений pH. Избыток кислоты (или щелочи) в субстрате нужно нейтрализовать перед последним разведением раствора исследуемого материала.

3. Органические растворители, применявшиеся при подготовке исследуемого материала, необходимо удалять при слабом нагревании в токе азота. Примеси 3%-ного этанола не вредят анализу. Концентрация этанола 5% ингибирует фермент на 50% (продолжительность реакции увеличивается).

Липоксидаза окисляет и изомеризует только те полиненасыщенные жирные кислоты, двойные связи которых разделяются цис-метиленовой группой одна от другой. Биологически важные кислоты (линолевая, линоленовая и арахидоновая) являются субстратами фермента. Сложные эфиры полиненасыщенных кислот также подвергаются действию фермента. Однако, по сравнению с окислением калиевых солей свободных жирных кислот, реакция протекает исключительно медленно.

Независимо от числа двойных связей на 1 *моль* жирной кислоты образуется только 1 *моль* диэнгидроперекиси, таким образом, этот способ не может служить для идентификации различных полиненасыщенных жирных кислот. Это удается спектрофотометрически после изомеризации щелочью или посредством газовой хроматографии.

Описанным способом с липоксидазой[1] можно определить до 5 *мкг* (0,018 *мкмолей*) линолевой кислоты. Этот способ применялся при анализе свободных жирных кислот, эфиров, масел, жиров, гидрированных растительных масел, плазмы крови, семян растений и микроорганизмов. Точность метода около 5%.

Определение ванилилминдальной кислоты [24, 25]

П р и н ц и п. В методе используется дегидрогеназа *L*-миндальной кислоты из Pseudomonas fluorescens A-312, которая катализирует превращение ванилилминдальной кислоты (ВМК) в ванилин. Метод специфичен для ВМК, так как ванилин (конечный продукт превращения ВМК) имеет максимальное поглощение при 350 *ммк*.

Катехоламины выделяются в мочу как неизменные, так и после их превращения в ванилилминдальную кислоту и другие производные. Так как концентрация ВМК в моче приблизительно в 5 раз больше концентрации неразрушенных катехоламинов, уровень ВМК в моче служит показателем содержания адреналина и норадреналина.

Данная методика, как и метод Пизано и др. [26], специфична, но менее громоздка.

---

[1] КФ 1.13.1.13.

Реактивы: 1) 0,5 *М* раствор трис-буфера, pH 7,8, содержащий 0,006 *М* меркаптоэтанола. 2) Дауэкс-50×8-Н⁺. Смолу промывают 2 н. раствором HCl, затем свободной от кислоты водой и просушивают при комнатной температуре; 3) этилацетат; 4) глицерин; 5) ванилилминдальная кислота (ВМК).

Получение дегидрогеназы L-миндальной кислоты. Pseudomonas fluorescens A-312 выращивают в среде [27], которая содержит миндальную кислоту для образования фермента. Клетки выращиваются до лаг-стадии развития (2×10^8 в 1 *мл*); 1 *л* суспензии клеток центрифугируют на холоду и промывают трижды 1%-ным раствором KCl (в/о).

Собранные клетки суспендируют в 0,5 *М* трис-буферном растворе, содержащем 0,006 *М* меркаптоэтанола, и пропускают через пресс при 10 000 psi. После этого для удаления клеточных обломков клеточную суспензию центрифугируют со скоростью 7000 *g* в течение 30 мин. Осадок, содержащий ферменты, растворяют в 5 *мл* 25%-ного раствора глицерина (о/о), который содержит 0,5 *М* трис-буфера и 0,006 *М* меркаптоэтанола.

Приготовленный таким образом ферментный препарат стабилен неограниченное время при —10°, 0,1 *мл* аликвоты этого фермента должен содержать около 0,10 *мг* белка.

Техника. *Постановка опыта.* 1 *мл* мочи, подкисленной до pH 1—2, добавляют к 0,5 *мл* высушенной смолы Дауекс-50×8-Н⁺; смесь энергично встряхивают 1 мин., после чего центрифугируют в течение 5 мин. при 2000 *об/мин.*

Надосадочную жидкость добавляют к 5 *мл* этилацетата и сильно встряхивают 1 мин.; этилацетат (верхний слой) удаляют и сохраняют, водный слой экстрагируют 5 *мл* этилацетата и его также сохраняют.

После смешивания двух экстрактов этилацетат удаляют выпариванием в вакууме при температуре 30° в ротационном приборе.

Оставшийся после выпаривания осадок растворяют в 3 *мл* 0,5 *М* трис-буферного раствора, pH 7,8, содержащем 0,006 *М* меркаптоэтанола; раствор переносят в кювету, добавляют 0,1 *мл* ферментного препарата и перемешивают. Отсчет производят немедленно при 360 *ммк*. Смесь оставляют при комнатной температуре в течение 2 час., после чего делают конечный отсчет.

Кроме этого, для построения стандартной кривой разных концентраций ВМК стандартные количества ВМК добавляют к каждому образцу мочи и обрабатывают аналогично (этой предосторожностью исключается влияние ингибитора, который может присутствовать в моче, хотя он пока не обнаружен).

Расчет результатов производят по правилам фотоэлектрической колориметрии. Детали расчета см. [25].

Относительно методов определения ВМК см. также статью В. В. Меньшикова и Т. Д. Большакова в книге «Адреналин и норадреналин», изд-во «Наука», М., 1964, стр. 284.

Источники ошибок. Хотя максимум поглощения для ванилина находится при 350 *ммк*, отсчет производят при 360 *ммк*, чтобы избавиться от отклонений, которые могут быть результатом присутствия *п*-оксиминдальной кислоты в моче в больших концентрациях. Ванилин, который присутствует в моче в разных концентрациях в виде нормального продукта обмена, не влияет на превращение ВМК в ванилин и не мешает определению ВМК, так как она определяется по повышению способности поглощения с нулевой точки шкалы. Некоторые ароматические аминокислоты в больших концентрациях могут слегка ингибировать реакцию, но их удаляют обработкой Дауексом-50.

Специфичность ферментативного метода определения ВМК заключается в образовании ванилина, который вызывает характерное повышение поглощения при 360 *ммк*. Авторы не смогли отделить дегидрогеназу *L*-миндальной кислоты от декарбоксилазы бензоилмуравьиной кислоты, но это не мешает методу. Метод пока не проверен другими лабораториями.

Мочу лучше собирать в кислой среде, добавляя в сосуд для сбора мочи 5—10 *мл* 3 н. раствора HCl на 1 *л* мочи. В кислой среде и при низкой температуре ВМК может сохраняться в моче в течение нескольких месяцев. За сутки до начала сбора мочи необходимо исключить из пищи продукты и лекарства, содержащие ванилин.

Определение глюконовой кислоты [28]

Метод основан на переводе (действием глюконокиназы[1] и дегидрогеназы 6-фосфоглюконовой кислоты [2]) глюконовой кислоты в рибулозо-5-фосфат и CO_2. Благодаря одновременному восстановлению эквивалентного количества НАД анализ можно закончить, измеряя прирост экстинкции при 340 *ммк* после прибавления глюконовой кислоты. Детали метода см. [28].

Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

Определение аскорбиновой кислоты

Ратке и Смит [29] описали микрометод колориметрического определения *L*-аскорбиновой кислоты. Метод основан на измерении способности исследуемой пробы восстанавливать 2,6-дихлорфенолиндофенол до и после окисления содержащейся в пробе *L*-ксилоаскорбиновой кислоты при помощи специфической оксидазы *L*-ксилоаскорбиновой кислоты из спор Myrothecium verrucaria. 1 *мл* исследуемого раствора, содержащего не более 25—50 *мкг* *L*-ксилоаскорбиновой кислоты и стабилизированного добавлением

[1] КФ 2.7.1.12.
[2] КФ 1.1.1.43.

$5 \cdot 10^{-5}$ *М* раствора ЭДТА и 3%-ного раствора метафосфорной кислоты, инкубируют 10—15 мин. при 30° с 1,2 *мл* 0,067 *М* фосфата натрия и 0,032 *М* цитратного буферного раствора, pH 6,0 и 0,8 *мл* водного экстракта разрушенных спор *M.* verrucaria [29] (опытная проба) или воды (контрольная проба). 1 *мл* инкубированного раствора смешивают с 0,5 *мл* 15 *М* ацетатного буферного раствора, pH 4,0, добавляют 1 *мл* раствора $3 \cdot 10^{-1}$ *М* 2,4-дихлорфенолиндофенола в 0,02%-ном растворе $NaHCO_3$. Невосстановленный 2,6-дихлорфенолиндофенол экстрагируют 5 *мл* ксилола и фотометрируют при 510 *ммк*.

Количество *L*-ксилоаскорбиновой кислоты рассчитывают по разности содержания невосстановленного 2,6-дихлорфенолиндофенола в контрольной и опытной пробах. Метод позволяет определять *L*-ксилоаскорбиновую кислоту в присутствии *L*-глюкозоаскорбата, *D*-глюкозоаскорбата, редуктона, редуктата и других ендиолов. *D*-арабоаскорбат мешает определению *L*-ксилоаскорбиновой кислоты, подавляя активность ферментного препарата. Данных относительно применения метода другими лабораториями не имеется. Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

Определение янтарной кислоты

Кларк и Портеус [30] описали метод определения сукцината, основанный на колориметрическом определении формазана, образующегося при восстановлении 2-(*n*-йодфенил)-3-(*n*-нитрофенил)-5-тетразолийхлорида за счет окисления сукцината в присутствии сукцинатдегидрогеназы [1] из печени крыс.

Для определения сукцината 0,2 *мл* 0,5%-ного раствора 2-(*n*-йодфенил)-3-(*n*-нитрофенил)-5-тетразолийхлорида добавляют к 0,5 *мл* смеси фосфатного буфера, pH 7,6 (50 *мкмолей*), ЭДТА (2,5 *мкмоля*) и сахарозы (25 *мкмолей*).

Пробирки со смесью помещают на лед и добавляют 0,1 *мл* суспензии свежей диализованной сукцинатдегидрогеназы, содержащей 5—10 *мг/мл* белка. Затем в смесь вводят растворы сукцината (неизвестной или стандартной концентрации) до общего объема 1 *мл*. Конечное значение pH 7,6. Пробирки оставляют на льду, а затем инкубируют 60 мин. при 37°. Реакцию останавливают добавлением 1 *мл* 10%-ного раствора ТХУ, охлаждают и экстрагируют 4 *мл* этилацетата, определяя затем экстинкцию органического слоя при 490 *ммк*. В пределах концентраций сукцината от 0,01 до 0,2 *мкмолей* существует линейная зависимость между E_{490} и количеством сукцината. Ацетат, цитрат, пируват, α-оксиглутарат и *L*-глутамат натрия слегка повышают, а малонат, фумарат и щавелевоуксуснокислый натрий заметно снижают E_{490}, т. е. выход формазана. Детали анализа см. [30]. Данных относительно проверки метода другими лабораториями не имеется.

---

[1] КФ 1.3.99.1.

Сравнительно хорошо воспроизводимые результаты дает другой метод с применением сукцинатдегидрогеназы, детали которого см. [31].

Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Rabinowitz J.* a. *Pricer W.* J. Biol. Chem., 1957, **229**, 321.
2. *Grant W.* Anal. Chem., 1948, **20**, 267.
3. *Pickett M.* et al. J. Biol. Chem., 1944, **156**, 303; см. также *Perlin A.* Anal. Chem., 1954, **156**, 303.

3a. *Holzer H.* u. *Holldorf A.* Bioch. Zeitschr., 1957, **329**, 292.

4. *Fugmann U.* et al. IV Intern. Kongr. Bioch. Zusammenfassungen. London, 1958; S. 175; см. также *Lundquist F.* см. [15], стр. 303.
5. *Williamson D.* et al. Bioch. J., 1962, **82**, 90.

5a. *Hohorst H.* Dissertation. Univers. Marburg, 1960; *Hohorst H.* u. *Reim M.* см. [15], стр. 335.

6. *Holzer H.* u. *Holldorf A.* Bioch. Zeitschr., 1957, **329**, 283.
7. *Hohorst H.* см. [15], стр. 226.
8. *Freidland J.* a. *Dietrich L.* Anal. Bioch., 1961, **2**, 390.
9. *Clarke A.* a. *Podmore D.* Clin. Chim. Acta, 1966, **13**, 725.
10. *Loomis M.* J. Lab. Clin. Med., 1961, **57**, 666.
11. *Rosenberg J.* a. *Rush B.* Clin. Chem., Acta, 1966, **12**, 299.
12. *Bücher Th.* et al. см. [15], стр. 253.
13. *Gloster H.* a. *Harris H.* Clin. Chim. Acta, 1962, **7**, 206.

13a. *Holzer H.* u. *Holldorf A.* Biochem. Zeitschr., 1957, **329**, 292.

14. *Williamson D.* et al. Bioch. J., 1962, **82**, 90.
15. *Bergmeyer H.* Methoden der Enzymatischen Analyse. Weinheim, 1962, S. 324.
16. *Singer T.* u. *Lusty C.* см. [15], стр. 346.
17. *Dagley S.* a. *Dawes E.* Enzymologia, 1953, **16**, 226.
18. *Gauron O.* et al. J. Amer. Chem. Soc., 1961, **83**, 3634.
19. *Friedmann H.* a. *Vennesland B.* J. Biol. Chem., 1958, **233**, 1398.
20. *Friedmann H.* a. *Vennesland B.* J. Biol Chem., 1960, **235**, 1526.

20a. *Rosenbloom J.* a. *Seegmiller G.* J. Lab. Clin. Med., 1964, **63**, 492.

21. *Greiling H.* et al. H.-S. Zeitschr. physiol. Chem., 1960, **319**, 161.
22. *Greiling H.* Zeitschr. Rheumaforsch., 1961, **20**, 298.
23. *Sullmann H.* Klin. Wochenschr., 1960, N 39, 286.
24. *Carmen L.* Clin. Chem., Acta, 1964, **8**, 673.
25. *Kopin J.* Science, 1960, **131**, 1372.
26. *Pisano J.* et al. Clin. Chim. Acta, 1962, **7**, 285.
27. *Sleeper B.* a. *Stainer R.* J. Bacter., 1950, **59**, 117.
28. *Leder S.* J. Biol. Chem., 1957, **225**, 125.
29. *Rathke M.* a. *Smith S.* Jowa State J. Sci., 1964, **38**, 385.
30. *Clark B.* a. *Porteous J.* Bioch. J., 1964, **93**, 21.
31. *Massey V.* a. *Singer T.* J. Biol. Chem., 1957, **228**, 263.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ ФОСФАТОВ

Определение *L*-(—)-глицерин-1-фосфата [1]

Принцип. Глицерин-1-фосфатдегидрогеназа [1] (ГФДГ) катализирует дегидрирование *L*-(—)-глицерин-1-фосфата посредством никотинамидадениндинуклеотида (НАД):

$$L\text{-(—)-глицерин-1-фосфат} + \text{НАД} \rightleftarrows \text{диоксиацетонфосфат} + \text{НАД-Н} + \text{H}^+ \quad (1)$$

Равновесие реакции лежит далеко влево. Константа равновесия составляет при 25° $K_c = 5{,}8 \times 10^{-12}$ *М/л*. Практически количественное дегидрирование *L*-(—)-глицерин-1-фосфата действием НАД удается осуществить, когда продукты реакции удаляются из среды. Протоны связываются щелочной реакционной средой, диоксиацетонфосфат (ДАФ) улавливают в виде гидразона. Вследствие этого уравнение, лежащее в основе фотометрического измерения, для *L*-(—)-глицерин-1-фосфата принимает следующий вид:

$$L\text{-(—)-глицерин-1-фосфат} + \text{НАД}^+ + \text{гидразин} \xrightarrow[\text{pH 9,5}]{\text{ГФДГ}} \text{ДАФ-гидразон} + \text{НАД-Н} + \text{H}_3\text{O}^+.$$

Для количественного и достаточно быстрого превращения *L*-(—)-глицерин-1-фосфата необходимы довольно высокие концентрации НАД и ГФДГ. Течение реакции измеряют спектрофотометрически (увеличение экстинкции происходит благодаря образованию НАД-Н).

Реактивы (примерно для 20 анализов). Все растворы готовят на свежеполученной бидистиллированной воде: 1) карбонат калия (приблизительно 5 *М* раствор): около 69 *г* K_2CO_3 растворяют в воде и доводят объем до 100 *мл*; 2) индикатор—метилоранж: около 50 *мг* метилоранжа растворяют в 100 *мл* воды; 3) хлорная кислота (около 6% раствора в/об): около 7,7 *мл* $HClO_4$ (плотность 1,67) разводят водой до 150 *мл*; 4) буферный раствор гидразинглицина (0,4 *М* гидразина, 1 *М* глицина, рН 9,5): в небольшом количестве бидистиллированной воды смешивают 7,5 *г* глицина, 5,2 *г* сульфата гидразина и 0,2 *г* ЭДТА-$Na_2H_2 \cdot 2H_2O$; к полученной взвеси добавляют 51 *мл* 2 н. раствора едкого натра и доливают водой до 100 *мл*; 5) никотинамидадениндинуклеотид (около $5 \cdot 10^{-2}$ *М* раствор НАД):

[1] КФ 1.1.99.5.

40 *мг* НАД растворяют в 1 *мл* воды; 6) глицерин-1-фосфатдегидрогеназа (ГФДГ), около 6 *мг* белка на 1 *мл*: взвесь фермента, содержащую около 10 *мг* белка в 1 *мл* 2,0 *М* раствора сульфата аммония, разбавляют соответственно водой.

Все растворы сохраняют в закупоренных склянках в холодильнике при 0—4°. Раствор НАД нет необходимости нейтрализовать из-за высокой емкости гидразинглицинового буферного раствора, и его можно сохранять неделями. Щелочной гидразинглициновый буферный раствор можно употреблять лишь в течение недели; лучше всего готовить основной раствор из сульфата гидразина, глицина и динатриевой соли ЭДТА. Практически он сохраняется неограниченное время, и в зависимости от потребности можно небольшими порциями раствора едкого натра устанавливать pH его равным 9.5.

Техника. *Подготовка исследуемого материала*. Пробы тканей тотчас (в доли секунды) замораживают и не дают им оттаять до осаждения белков.

Для осаждения белков к исследуемой пробе приливают раствор хлорной кислоты. Имеются две возможности экстракции: 1) однократная экстракция с вычислением объема экстракта на основании принятого среднего содержания воды в исследуемом материале и 2) повторные — количественные экстракции ткани. Первый способ следует применять, когда надо определить только глицерин-1-фосфат и когда имеют дело с легко растворимой тканью, например с печенью. Второй способ следует предпочесть, когда в том же экстракте должны быть определены еще другие метаболиты. При однократной экстракции работу проводят с соотношением объема экстракта к весу ткани, равным 4 : 1. Если для ткани принимают содержание воды 75%, то к 2 *г* ткани следует добавить 6,5 *мл* 6%-ного раствора хлорной кислоты. При повторной экстракции выбирают отношение объема экстракта к весу ткани, равное 8 : 1. Обычно достаточно экстрагировать дважды и дополнять экстракт соответственно отношению объема к весу, равному 8 : 1. Ошибка вследствие остатков вещества в осадке составляет тогда максимально 3—4%.

Однократная экстракция осуществляется следующим образом: в центрифужную пробирку, снабженную стеклянной мешалкой, отмеривают 5 *мл* раствора хлорной кислоты (3), взвешивают и добавляют около 2 *г* порошка ткани (измельченной в замороженном виде). Тотчас же хорошо смешивают и снова взвешивают. По увеличению веса (равному весу пробы ткани) вычисляют требуемый общий объем хлорной кислоты и соответственно добавляют к имеющимся 5 *мл* раствора требуемое количество хлорной кислоты (3). Взвесь тщательно перемешивают, растирают комочки ткани стеклянной палочкой по стенкам пробирки и центрифугируют в течение 5 мин. Надосадочную жидкость переливают в охлажденный 10-миллилитровый сосуд для нейтрализации.

Повторная экстракция: в центрифужную пробирку, снабженную стеклянной мешалкой, отмеривают 5 *мл* раствора хлорной кислоты (3) и взвешивают; добавляют около 1 *г* порошка замороженной тка-

ни, тотчас же хорошо перемешивают и вновь взвешивают. Если нужно, материал размельчают в гомогенизаторе. Центрифугируют приблизительно в течение 5 мин. при 3000 *g*. Надосадочную жидкость сливают, а осадок взбалтывают в 1 *мл* раствора хлорной кислоты (3) + 1 *мл* воды и снова центрифугируют. Надосадочные жидкости соединяют, определяют объем и добавляют воды до 8 *мл* на 1 *г* веса.

Добавляют пипеткой 0,02 *мл* раствора индикатора (2) к каждым 6 *мл* экстракта ткани, интенсивно размешивают магнитной мешалкой, затем вливают (при охлаждении на льду) 0,1 *мл* раствора карбоната (1) из 1-миллилитровой мерной пипетки, ждут пока поднявшаяся пена CO_2 не исчезнет, и снова добавляют раствор карбоната, пока жидкость не приобретет розовую окраску (pH около 3,5). Для этого требуется около 0,16 *мл* раствора карбоната. Оставляют стоять на 10 мин. в ледяной воде, жидкость сливают или отсасывают пипеткой с осажденного хлората. Аликвотную часть раствора берут для анализа.

Постановка опыта. Отношение общего объема к объему пробы не должно превышать 2 : 1, чтобы гидразинглициновый буферный раствор не был бы слишком сильно разведен. Целесообразно постоянно выбирать одинаковую пропорцию разведения, чтобы измеренные различия экстинкции для вычисления результата приходилось бы умножать только на один, однажды установленный фактор. Можно не ставить сравнительного или слепого опыта и вести измерение против воздуха или против воды. Измерение ведут при длине волны 340, 334 или 366 *ммк*. Для измерений при 340 и 334 *ммк* толщина слоя 1 *см*; объем анализируемой жидкости 1,01 *мл*. Отмеривают пипеткой: в кювету с главным опытом — 0,45 *мл* гидразинглицинового буферного раствора (4), 0,05 *мл* раствора НАД (5), 0,050 *мл* безбелкового экстракта; в кювету для сравнения — воду или, в особых случаях (см. ниже «Источники ошибок»),— то же, что и в кювету с главным опытом, но без фермента.

Если измерение ведут при длине волны 366 *ммк*, то толщина слоя жидкости составляет 2 *см*, объем анализируемой жидкости 2,02 *мл*. Отмеривают пипеткой: в кювету с главным опытом — 0,9 *мл* гидразинглицинового буферного раствора (4), 0,1 *мл* раствора НАД (5), 1,0 *мл* безбелкового экстракта; в кювету для сравнения — воду или, в особых случаях,— то же, что в кювету с главным опытом, но без фермента.

Основательно размешивают, содержимое кювет доводят до комнатной температуры и дважды измеряют экстинкцию E_1 с промежутком в 3 мин. После этого в кювету с главным опытом приливают при взбалтывании 0,01 *мл* взвеси ГФДГ (6).

После окончания реакции (10—20 мин. после добавления фермента в зависимости от концентрации глицерин-1-фосфата) два раза измеряют экстинкцию E_2 с промежутком в 3 мин. Изменения начальной экстинкции E_1 и конечной экстинкции E_2 за 3 мин. обычно незначительны, и ими можно пренебречь в отношении разницы экстинкции $\Delta E = E_2 - E_1$. Величина ΔE должна составлять: при 340 *ммк* не

более 1,0 (при 366 *ммк* $E_{366} \approx 0{,}53$). Если E_2, спустя 20 мин. после добавления фермента, продолжает повышаться, в то время как начальная экстинкция E_1 в течение 3 мин. остается постоянной, то, по всей вероятности, активность глицерин-1-фосфатдегидрогеназы (см. стр. 229) недостаточно значительна, если не допущены другие нарушения.

Для проверки, после окончания реакции, в кювету с главным опытом прибавляют 0,01 *мл* 0,002 *M* раствора *L*-(—)-глицерин-1-фосфата. Повышение экстинкции должно при этом закончиться через 10—20 мин. Экстинкцию E_3 дважды измеряют в течение 3 мин. и получают разницу $\Delta E' = E_3 - E_2$. При указанных условиях ΔE должна составлять: при 340 *ммк* 0,123, при 366 *ммк* 0,065.

Вычисление. *L*-(—)-глицерин-1-фосфат превращается количественно, так что содержание его в пробе может быть вычислено из разницы экстинкций:

$$\frac{\Delta E \cdot \text{развед.}}{\varepsilon \cdot d} = \text{мкмолям глицерин-1-фосфата в 1 г ткани},$$

где ΔE — разница экстинкций ($E_2 - E_1$), развед.— общее разведение пробы, ε — коэффициент экстинкции в *см²/мкмоль*, d — толщина слоя в *см*.

При одинаковых условиях разведения уравнение упрощается, так как найденные различия экстинкций (для вычисления результатов) можно умножать на один и тот же фактор F. Получают уравнение: $\Delta E \cdot F =$ *мкмолям* глицерин-1-фосфата на 1 *г* ткани. Если отношение объем экстракта : навеска ткани равно 4 : 1, то отношение объем нейтрализованного экстракта : навеска ткани составит 4,1 : 1.

Разведение экстракта в пробе равно 2,02 : 1. Общее разведение 8,28 : 1; для F получают: при 334 *ммк* — 1,36; при 340 *ммк* — 1,32; при 366 *ммк* — 1,25.

Если отношение объем экстракта : навеска ткани равно 8,0 : 1-то объем нейтрализованного экстракта : навеска ткани составит 8,2 : 1.

Разведение экстракта в пробе — 2,02 : 1; общее разведение — 16,5 : 1, для F_{366} получают: при 334 *ммк* — 2,72; при 340 *ммк* — 2,64; при 366 *ммк* — 2,51. При 366 *ммк* коэффициент экстинкции зависит от температуры; приведенные здесь для F_{366} значения относятся к 25°.

Пример. 5 *мл* хлорной кислоты были прибавлены к 1,276 *г* ткани (печень крысы). Объем экстракта после двукратной экстракции составлял 7,6 *мл*. После добавления 2,6 *мл* хлорной кислоты объем был доведен до 10,2 *мл* (объем экстракта : вес ткани = 8 : 1).

Раствор нейтрализовали и измерение провели при длине волны 334 *ммк* и толщине слоя 1 *см*. В кювету для сравнения наливают воду. До добавления ГФДГ: 0 мин. $E_1 = 0{,}148$; через 3 мин. $E_1 = 0{,}150$; после добавления ГФДГ: через 10 мин. $E_2 = 0{,}241$; через 13 мин. $E_2 = 0{,}243$; $\Delta E = E_2 - E_1 = 0{,}241 - 0{,}148 = 0{,}093 \times$ $\times 0{,}093 \times 2{,}72 = 0{,}253$ *мкмолям* глицерин-1-фосфата на 1 *г* ткани.

Другие определения. В той же пробе могут быть определены другие метаболиты добавлением специфических ферментов, например L-(+)-лактат и L-(—)-малат.

Источники ошибок. 1. Если в течение 30 мин. не достигается постоянное конечное значение, это означает, что активность глицеринфосфатдегидрогеназы слишком незначительна. Следует проверить активность фермента и, по возможности, применять бо́льшие количества или новый препарат фермента. 2. Начальная экстинкция непостоянна. Причины: а) содержимое кюветы не было доведено перед началом измерения до комнатной температуры; б) гидразиновый (глициновый) буферный раствор хранился более 8 дней; в) препарат НАД не был очищен; г) изменение собственной окраски экстракта ткани. В последнем случае измерение ведут против контрольной кюветы, которая содержит, кроме фермента, тот же раствор, что и кювета с главным опытом. 3. Добавление фермента вызывает скачок экстинкции. Если экстинкция повышается, то препарат фермента большей частью имеет слишком высокую собственную абсорбцию. Чтобы избежать этого, берут новый препарат фермента. Если экстинкция понижается, то гидразинглициновый буферный раствор слишком щелочной. При рН $> 9{,}6$ исходная экстинкция пробной смеси является большей. Добавление фермента означает добавление сульфата аммония, который понижает значение рН и, таким образом, вызывает отрицательный скачок экстинкции. 4. Экстинкция проходит через максимум (особенно при более высокой температуре, например 37°); причина: самоокисление НАД-H_2. Чтобы устранить это, из кюветы опыта отсасывают воздух.

Проба специфична для L-(—)-глицерин-1-фосфата. Вращающий вправо изомер не реагирует. Рацематы, таким образом, реагируют только на 50%. Глицерин-2-фосфат (β-глицерофосфат), серинфосфат, глицеринфосфорилхолин и глицеринфосфорилхоламин не реагируют. Точность метода около 2%.

Определение *D*-глицерат-1,3-дифосфата [1а]

Принцип. Для определения D-глицерат-1,3-дифосфата применяют реакцию

$$\text{глицеринальдегид-3-фосфат} + \text{фосфат} + \text{НАД} \rightleftarrows \text{глицерат-1,3-дифосфат} + \text{НАД-Н} + \text{Н}^+, \quad (1)$$

которая протекает достаточно полно справа налево, если исходит из растворов, свободных от неорганического ортофосфата. Избыток НАД-H_2 приблизительно в 10% достаточен при рН 7.9. Реакция катализируется глицеринальдегид-3-фосфатдегидрогеназой (ГАФДГ): 1 *моль* D-глицерат-1,3-дифосфата использует 1 *моль* НАД-H_2. Уменьшение НАД-H_2 измеряют спектрофотометрически. Количество фермента подбирают так, что реакция заканчивается в несколько минут.

Стрихнин приблизительно в эквивалентном количестве не мешает реакции. Поэтому таким же образом может быть определена кристаллизирующаяся стрихниновая соль глицерин-1,3-дифосфата.

Реактивы (применяют свежую дистиллированную воду или бидистиллированную воду из луженной оловом аппаратуры): 1) пирофосфатный буферный раствор (0,10 *M*, pH 7,9): 4,47 *г* $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$ растворяют примерно в 20 *мл* дистиллированной воды, добавляют 6,0 *мл* 1н. раствора HCl, доливают водой до 100 *мл*; 2) восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (около $2{,}2 \times 10^{-3}$ *M* НАД-H_2): 4,1 *мг* НАД-H-Na_2 растворяют в 2 *мл* дистиллированной воды; 3) *D*-глицеринальдегид-3-фосфатдегидрогеназа, ГАФДГ (1 *мг* белка на 1 *мл*): кристаллическую взвесь фермента разбавляют дистиллированной водой примерно до 1 *мг* белка на 1 *мл*.

Пирофосфатный буферный раствор должен быть свободен от ортофосфата, поэтому его хранят не дольше нескольких дней. Раствор НАД-H_2 также можно сохранять лишь несколько дней при 0°.

Раствор фермента приготовляют ежедневно свежим и хранят при 0°.

Техника. Глицерат-1,3-дифосфат — лабильное вещество, распадающееся самопроизвольно на глицерат-3-фосфат и неорганический фосфат. Не известно ни одного состояния, в котором это вещество сохранялось бы длительное время в неизменном виде. Скорость распада зависит от температуры и pH раствора. При pH 7,2 и 38° период полураспада составляет 27 мин., т. е. в каждую минуту распадаются 2,6% вещества. В водном растворе скорость распада меньше всего при слабощелочной реакции; при pH выше 7—9 и при 0° за 24 часа распадается около 6%. Вещество несколько устойчивее, когда оно хранится в слабощелочном растворе замороженным при температуре ниже 0°. При этих условиях через 24 часа была обнаружена потеря приблизительно 3%. В высушенном состоянии вещество неустойчиво; распадаются нейтральная и кислая соли Na, аморфная соль Ca и кристаллизованная соль стрихнина. Молибдат настолько ускоряет гидролиз в кислом растворе, что слабо связанная фосфорная кислота отщепляется при колориметрировании и определяется в качестве неорганической фосфорной кислоты.

Подготовка исследуемого материала. В живой клетке при физиологических условиях концентрация глицерат-1,3-дифосфата так мала, что ее определение вряд ли возможно. Равновесие как реакции окислительного фосфорилирования, так и потребляющей, переносящей фосфат реакции, находится в пределах очень незначительной стационарной концентрации. В клетке концентрация и активность фермента, расщепляющего глицерат-1,3-дифосфат, несомненно больше, чем концентрация и активность фермента, в присутствии которой образуется это вещество. Поэтому можно ставить только опыт с обогащенной *D*-глицерат-1,3-дифосфатом пробой.

Для обогащения *D*-глицерат-1,3-дифосфатом может быть применена реакция окислительного фосфорилирования (1), которая

почти полностью протекает с небольшим количеством НАД$^+$ слева направо, когда она сочетается с реакцией:

$$\text{НАД-Н} + \text{H}^+ + \text{ацетальдегид} \rightleftarrows \text{НАД}^+ + \text{этанол}. \quad (2)$$

При этом НАД-H_2, образующийся по (1), удаляют из раствора и в балансе получают:

$$D\text{-глицериназльдегид-3-фосфат} + \text{фосфат} + \text{ацетальдегид} \rightleftarrows$$
$$\rightleftarrows D\text{-глицерат-1,3-дифосфат} + \text{этанол}. \quad (3)$$

Глицерат-1,3-дифосфат может быть определен и изолирован от других компонентов реакции и фермента посредством осаждения ацетоном при pH 2,1. Для этого реакционную смесь подкисляют 1 н. раствором серной кислоты до pH 2,1 и тотчас выливают его в 10-кратный объем холодного ацетона. Осадок отделяют центрифугированием на холоду, один раз промывают холодным ацетоном и высушивают в вакуум-эксикаторе. Так как глицерат-1,3-дифосфат неустойчив и в сухом состоянии, вещество тотчас растворяют в нескольких миллилитрах воды. Нерастворимый денатурированный белок отфильтровывают, а прозрачный кислый раствор нейтрализуют 1 н. раствором едкого натра.

Используя для опыта $4{,}4 \cdot 10^{-4}$ *M* *D*-глицериназльдегид-3-фосфата, получают $3{,}6 \cdot 10^{-4}$ *M* *D*-глицерат-1,3-дифосфата. Выход составляет, таким образом, от 80 до 85%; глицерат-1,3-дифосфат нельзя отделить, если он имеется в слишком малой концентрации. Лучших средств для осаждения белка пока неизвестно. Анализируемый раствор должен быть свободным от ингибирующих ферментов и от веществ, осаждающих белки. Ввиду лабильности глицерат-1,3-дифосфата раствор при осаждении белков должен быть лишь слабо подкислен. Детали анализа см. [30].

Определение *D*-2,3-дифосфоглицерата [2]

Принцип. *D*-2,3-дифосфоглицерат играет роль кофактора в реакции

$$\text{3-фосфоглицерат} \rightleftarrows \text{2-фосфоглицерат}, \quad (1)$$

которую катализирует фосфоглицератмутаза [1]. Начальная скорость реакции пропорциональна концентрации 2,3-дифосфоглицерата, если этого соединения не содержится в избытке. Определение содержания 2,3-дифосфоглицерата в пробе ведут, используя для сравнения стандартные растворы. Перед реакцией (1) включают быструю реакцию (2), катализированную енолазой:

$$\text{фосфоенолпируват} \rightleftarrows \text{2-фосфоглицерат}. \quad (2)$$

Величиной измерения служит уменьшение экстинкции фосфоенолпирувата при 240 *ммк*.

---

[1] КФ 2.7.5.3.

Реактивы: 1) трис-буферный раствор (2,0 *М*, рН 7,4): 24,22 *г* трис-гидроксиметиламинометана растворяют в 50 *мл* дистиллированной воды, доводят рН до 7,4 посредством 5 н. раствора HCl и доливают дистиллированной водой до 100 *мл*; 2) хлорид магния (0,5 *М* раствор): 10,2 *г* $MgCl_2 \cdot H_2O$ растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*; 3) фосфоенолпируват (0,025 *М* раствор ФЕП): 581 *мг* соли ФЕП трициклогексиламмония растворяют в дистиллированной воде, дополняя объем до 5 *мл*; 4) стандартный раствор 2,3-дифосфоглицерата (10^{-5} *М*): 10 *мг* Ва соли растворяют в 10 *мл* 0,1 н. раствора HCl, удаляют Ba^{2+} ионитом Дауэкс-50 (H^+-форма), нейтрализуют 0,1н. раствором NaOH; определяют концентрацию 2,3-дифосфоглицерата измерением органически связанного фосфора[1] и разводят дистиллированной водой до получения 10^{-5} *М* раствора; 5) енолаза: препарат растворяют в дистиллированной воде до содержания 10 *мг* белка в 1 *мл*; продажный препарат из мышцы кролика[2] разводят дистиллированной водой до 1 *мг* белка на 1 *мл*; 6) фосфоглицератмутаза (см. стр. 659): препарат растворяют в дистиллированной воде до получения раствора, содержащего 0,7 *мг* белка на 1 *мл*; продажный препарат из мышцы разводят дистиллированной водой до 1 *мг* белка на 1 *мл*.

ФЭП и раствор 2,3-дифосфоглицерата сохраняются несколько недель в замороженном состоянии. Растворы фермента готовят свежими ежедневно. Концентрированные основные взвеси могут храниться при 0—4° много месяцев.

Техника. Исследуемый материал нагревают в течение 5 мин. при 100° или добавляют трихлоруксусную кислоту (50%-ный раствор, в/о) до тех пор, пока содержание в пробе трихлоруксусной кислоты не составит 5% (в/о). Центрифугируют, нейтрализуют надосадочную жидкость 1 н. раствором KOH. При применении трихлоруксусной кислоты концентрация 2,3-дифосфата в пробе должна быть так велика, чтобы для опыта использовать лишь немного (0,2—0,5 *мл*) очищенного от белка раствора. В противном случае присутствие трихлорацетата нарушает точность измерения при 240 *ммк*.

Постановка опыта. Измерения ведут при длине волны 240 *ммк* в кварцевых кюветах. Толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 1 *мл*, температура измерения 25° (постоянная для проб и калибровочной кривой). Измерение проводят против воды. В кювету отмеривают пипеткой: 0,02 *мл* трис-буферного раствора (1), 0,01 *мл* раствора $MgCl_2$ (2), 0,03 *мл* раствора ФЕП (3), 0,01 *мл* раствора енолазы (5), дистиллированной воды до 1 *мл* конечного объема. Экстинкция становится постоянной через 1 мин. и составляет 1,5. Добавляют 0,01 *мл* раствора фосфоглицератмутазы (6); приблизительно через 1 мин. экстинкция становится постоянной. Добав-

---

[1] В. С. Асатиани. Биохимическая фотометрия. М., Изд-во АН СССР, 1957, стр. 654.

[2] Получение препарата см.: R. Czoka. Th. Bücher. Advances in Protein Chemistry, 1960, 15, 373.

ляют 0,01—0,06 *мл* пробы (содержащей $1 \cdot 10^{-4}$ — $6 \cdot 10^{-4}$ *мкмолей* 2,3-дифосфоглицерата) или (для калибровочных опытов) 0,01—0,06 *мл* стандартного раствора 2,3-дифосфоглицерата (4) (соответственно $1 \cdot 10^{-4}$—$6 \cdot 10^{-4}$ *мкмолей* 2,3-дифосфоглицерата).

Включают секундомер. В течение 1—4 мин. каждую минуту измеряют экстинкцию. Уменьшение экстинкции $\Delta E/мин$ калибровочных опытов (ордината) наносят против концентрации (микромоли) 2,3-дифосфоглицерата (абсцисса).

Вычисление. Исходя из значений $\Delta E/мин$ опыта, по калибровочной кривой находят содержание 2,3-дифосфоглицерата.

Источники ошибок. Чтобы установить, не содержит ли проба ингибирующих веществ, анализируют пробу и калибровочное значение как в смеси, так и отдельно. При безупречном выполнении анализа результат смешанного опыта соответствует таковому суммы обоих отдельных опытов. Точность метода 3%.

Определение *D*-6-фосфоглюконовой кислоты [3]

Принцип. 6-фосфоглюконатдегидрогеназа[1] (6-ФГДГ) катализирует дегидрирование *D*-6-фосфоглюконата (глюконат-*D*-6-фосфоглюконовая кислота) никотинамидадениндинуклеотидфосфатом (НАДФ):

$$\text{6-фосфоглюконат} + \text{НАДФ}^{+} \rightleftarrows CO_2 + \text{рибулозо-5-фосфат} + \text{НАДФ-Н} + H^{+}.$$

Равновесие реакции лежит далеко на правой стороне, так что при незначительном избытке никотинамидадениндинуклеотидфосфата и при pH 7,8 может быть достигнуто количественное превращение *D*-6-фосфоглюконовой кислоты. Реакция протекает очень быстро; измеряют увеличение экстинкции, связанное с восстановлением НАДФ. Так как до сих пор было невозможно изготовлять 6-фосфоглюконатдегидрогеназу с достаточной степенью чистоты, особенно свободную от гексокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, то ферментативное определение *D*-6-фосфоглюконовой кислоты в ферментной пробе пока может проводиться только в растворах, которые не содержат ни глюкозы, ни глюкозо-6-фосфата, а не в тканевых экстрактах.

Реактивы (все реактивы готовят со свежеприготовленной бидистиллированной водой): 1) буферный раствор триэтаноламина (0,4 *М*, pH 7,6): 18,6 *г* триэтаноламингидрохлорида растворяют примерно в 200 *мл* бидистиллированной воды, добавляют 18 *мл* 2 н. раствора NaOH и доливают до 250 *мл*; 2) хлористый магний (0,1 *М* раствор): 2 *г* $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ растворяют в бидистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*; 3) никотинамидадениндинуклеотидфосфат (около $2 \cdot 10^{-2}$ *М* НАДФ): 20 *мг* НАДФ-NaH_2 растворяют в 1 *мл* бидистиллированной воды; 4) *D*-6-фосфоглюконатдегидрогеназа-6-ФГДГ (около 800 *ед/мл*): лиофилизированный пре-

---

[1] Глюконатдегидрогеназа 4.2.1.12.

парат (около 16 *мг* белка) помещают в 1 *мл* $M/25$ буферного раствора глицилглицина (pH 7,5); нерастворимый остаток отделяют центрифугированием на холоде. Все растворы сохраняют закупоренными в холодильнике при 0—4°. Растворенный фермент можно сохранять лишь несколько дней; лучше всего изготовлять требуемое ежедневно количество фермента свежим, растворяя лиофилизированный фермент.

Т е х н и к а. Концентрация *D*-6-фосфоглюконовой кислоты не должна выходить за пределы $1 \cdot 10^{-7}$ *М* на 1 *мл* объема пробы. Можно, однако, отказаться от слепого опыта. Исследуемый раствор должен быть свободным от глюкозо-6-фосфата и фруктозо-6-фосфата, значение pH должно лежать между 5 и 9.

Постановка опыта. Измерение ведут при 340, 334 и 366 *ммк*; толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 1,08 *мл*. Последовательно отмеривают пипеткой: в кювету опыта — 0,7 *мл* пробы, 1 *мл* буферного раствора (1), 0,01 *мл* раствора НАДФ (3), 0,05 *мл* раствора $MgCl_2$ (2); в контрольную кювету 2 *мл* буферного раствора (1). Основательно перемешивают содержимое кювет, доводят до комнатной температуры и дважды измеряют E_1 с промежутками в 3 мин. Затем в кювету опыта вливают при перемешивании 0,02 *мл* раствора 6-ФГДГ (4). После прекращения увеличения экстинкции (в зависимости от концентрации *D*-6-фосфоглюконата через 5—10 мин. после добавления фермента) два раза измеряют экстинкцию E_2 с промежутками в 3 мин. Изменения начальной экстинкции E_1 и конечной E_2 в течение 3 мин. обычно незначительны, и их можно не учитывать в отношении разницы экстинкции $\Delta E = E_2 - E_1$. В отдельных случаях следует внести поправку. Правильность хода анализа может быть легко проверена: после прекращения реакции в кювету опыта вносят 0,01 *мл* $2 \cdot 10^{-3}$ *М* раствора *D*-6-фосфоглюконовой кислоты. Повышение экстинкции заканчивается через 3 — 5 мин. Конечную экстинкцию E_3 дважды измеряют в течение 3 мин. и вычисляют разницу $\Delta E' = E_3 - E_2$.

$\Delta E'$ должно быть равно при 340 *ммк* 0,115, при 334 *ммк* — 0,112 и при 366 *ммк* — 0,061.

Вычисление. *D*-6-фосфоглюконовая кислота превращается при указанных условиях количественно, так что содержание ее в пробе может быть вычислено из разницы экстинкции E:

$$\frac{\Delta E \cdot V}{\varepsilon \cdot d \cdot V_p} = \text{мкмолям } D\text{-6-фосфоглюконовой кислоты/мл пробы},$$

где V — объем взятой в опыт пробы (в *мл*), V_p — объем раствора пробы (в *мл*), d — толщина слоя в кювете (в *см*), ΔE — разница экстинкций ($E_2 - E_1$), ε — коэффициент экстинкции ($= 3{,}30 \times 10^6$ *см²/мкмоль*).

Если измерение ведут при 366 *ммк*, то температуру содержимого кювет следует довести до 25°, так как коэффициент экстинкции при этой длине волны зависит от температуры.

Пример. Анализировали 0,4 *мл* раствора *D*-6-фосфоглюконата. Измерение вели при 340 *ммк*. Экстинкция перед добавлением 6-ФГДГ: 0 мин. $E_1 = 0{,}068$; 3 мин. $E_1' = 0{,}068$, после добавления 6-ФГДГ: 0 мин. $E_2 = 0{,}493$; 3 мин. $E_2' = 0{,}493$; $\Delta E = E_2 - E_1 = 0{,}425$;

$$\frac{0{,}425 \cdot 1{,}08}{6{,}28 \cdot 1{,}04} = 0{,}183 \text{ мкмоля } D\text{-6-фосфоглюконовой кислоты на 1 мл пробы.}$$

Метод специфичен для *D*-6-фосфоглюконовой кислоты, но только в отсутствие глюкозы, глюкозо-6-фосфата и фруктозо-6-фосфата. Глюконат в условиях опыта не реагирует. Точность метода 1,5%.

Нигэм [4] описал спектрофотометрический метод количественного определения 3-фосфоглицериновой кислоты, 2-фосфоглицериновой кислоты, фосфоенолпирувата и пирувата, основанный на превращении 3-фосфоглицериновой кислоты, 2-фосфоглицериновой кислоты, фосфоенолпирувата и пирувата при помощи мутазы 3-фосфоглицериновой кислоты, енолазы (см. стр. 658) и пируваткиназы (см. стр. 660) по схеме: 3-фосфоглицериновая кислота — мутаза 3-фосфоглицериновой кислоты; 2-фосфоглицериновая кислота — енолаза, пируваткиназа, пируват, с последующим восстановлением пирувата в присутствии НАД-H_2 и лактатдегидрогеназы и определением убыли НАД-H_2 по поглощению при 366 *ммк*. К смеси 1,0 *мл* 0,1 *М* трис-буферного раствора (рН 7,4), 0,5 *мл* 0,1 *М* триэтаноламинового буферного раствора (рН 7,5), 0,1 *мл* 0,1 *М* раствора сернокислого магния, 0,1 *мл* 1,0 *М* раствора хлористого калия и 0,3 *мл* 0,01 *М* раствора АДФ (натриевой соли) прибавляют 0,5 *мл* исследуемой пробы и 0,4 *мл* 0,001 *М* НАД-H_2, фотометрируют при 340 *ммк*, затем прибавляют 0,05 *мл* лактатдегидрогеназы (0,36 ед.), инкубируют 3—5 мин. при 25° до прекращения изменения оптической плотности и вновь фотометрируют. Разница в оптической плотности между этим и первым измерением дает количество пирувата в исследуемой пробе (уменьшение оптической плотности на 0,210 соответствует 0,1 *мкмоля* восстановленного пирувата). Затем к пробе прибавляют 0,05 *мл* пируваткиназы [1] (0,9 ед.), инкубируют 3—5 мин. и по изменению оптической плотности определяют количество фосфоенолпирувата. Аналогичным образом, добавляя последовательно 0,05 *мл* енолазы [2] (0,18 ед.) и 0,05 *мл* мутазы 3-фосфоглицериновой кислоты (0,28 ед.), определяют содержание 2-фосфоглицериновой и 3-фосфоглицериновой кислот (время инкубации в каждом случае 5—10 мин.).

Метод обеспечивает удовлетворительную точность при суммарном содержании в пробе определяемых субстратов около 3 *мкмолей*; использован для определения содержания 2- и 3-фосфоглицериновой кислот, фосфоенолпирувата и пирувата в раковых тканях.

---

[1] КФ 2.7.1.40.
[2] КФ 4.2.1.11.

Арезе [5] разработал метод определения 6-фосфоглюконовой кислоты по реакции с НАД-фосфатом, катализируемой дегидрогеназой *D*-6-фосфоглюконовой кислоты из Candida utilis. Дрожжи выращивают на мальтозо-агаровой питательной среде (3 дня, 30°), собирают центрифугированием. После автолиза дрожжей дегидрогеназу *D*-6-фосфоглюконовой кислоты осаждают из раствора добавлением сульфата аммония, собирают осадок, выпадающий при концентрациях соли 2,65—2,70 *М*. Осадок растворяют в 0,4 *М* глицилглициновом буферном растворе, pH 7,6; раствор обрабатывают углем, разбавляют до 60—65 *мл* и обрабатывают 2 *мл* геля фосфата кальция (68,5 *мг/мл*) 10 мин. при 0°; обработку повторяют 5—6 раз. Из надосадочной жидкости осаждают дегидрогеназу *D*-6-фосфоглюконовой кислоты добавлением сульфата аммония (концентрация 2,65—2,70 *М*). Осадок растворяют в 1,1 *мл* глицилглицинового буферного раствора, получают раствор дегидрогеназы *D*-6-фосфоглюконовой кислоты, выход 3000 единиц. Для построения калибровочной кривой к смеси 0,05 *мл* 0,0262 *М* раствора НАД-фосфата, 0,01 *мл* 0,325 *М* раствора хлористого магния, 0,02—0,05 *мл* раствора *D*-6-фосфоглюконовой кислоты, разбавленной 0,1 *М* триэтаноламин-солянокислым буферным раствором (pH 7,6) до 1 *мл* добавляют 5—8 *мл* раствора дегидрогеназы *D*-6-фосфоглюконовой кислоты (2400—2700 *ед/мл*) и измеряют изменение оптической плотности при 340 *ммк*.

Точность метода, по данным автора, около 1,5%. Содержание *D*-6-фосфоглюконовой кислоты в экстрактах печени крыс найдено равным 27,1 *мкмоля/г* сырого веса.

Определение *D*-седогептулозо-1,7-дифосфата [5]

Принцип. Альдолаза [1] катализирует реакцию:

$$D\text{-седогептулозо-1,7-дифосфат} \rightleftarrows \text{диоксиацетонфосфат} + D\text{-эритрозо-4-фосфат} \qquad (1)$$

Образовавшийся диоксиацетонфосфат окисляет восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (НАД - H_2) с участием α-глицерофосфатдегидрогеназы:

$$\text{диоксиацетонфосфат} + \text{НАД-Н} + H^+ \rightleftarrows \alpha\text{-глицерофосфат} + \text{НАД}. \qquad (2)$$

В реакции (1) с альдолазой образуется и диоксиацетонфосфат, поэтому это соединение следует определять отдельно, если Ф-1,6-ДФ (фруктозо-1,6-дифосфат) встречается наряду с седогептулозо-1,7-дифосфатом в исследуемой пробе. Такое определение можно провести при помощи глицеринальдегид-3-фосфатдегидрогеназы, которая окисляет в незначительной концентрации только глицеринальдегид-3-фосфат, не затрагивая *D*-эритрозо-4-фосфат, содержащийся,

[1] КФ 4.1.2.7.

возможно, в той же пробе:

$$D\text{-фруктозо-1,6-дифосфат} \rightleftarrows \text{диоксиацетонфосфат} + \\ + D\text{-глицеринальдегид-3-фосфат}; \quad (3)$$

$$D\text{-глицеринальдегид-3-фосфат} + \text{НАД}^{+} \rightarrow \text{3-фосфоглицерат} + \\ + \text{НАД-Н} + \text{H}^{+}. \quad (4)$$

Реактивы: 1) буферный раствор фосфата (0,1 *М*, pH 7,5): 0,90 *г* KH_2PO_4 + 6,00 *г* $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ растворяют в воде и доводят объем до 400 *мл*; 2) восстановленный дифосфоникотинамид-адениндинуклеотид (около $1{,}5 \cdot 10^{-3}$ *М* раствор НАД-H_2): 10 *мг* НАД-Н-Na_2 растворяют в воде и доводят объем до 5 *мл*; 3) глицерофосфатдегидрогеназа [1] — ГДГ (12 *мг* белка в 1 *мл*): взвесь фермента в растворе сульфата аммония разбавляют соответственно водой; 4) альдолаза (2 *мг/мл*): взвесь фермента в растворе сульфата аммония разбавляют соответственно водой.

Раствор НАД-H_2 сохраняется при —16° в течение нескольких недель. Разбавленные растворы фермента также хранятся при —16°, кристаллические взвеси его хранят в растворе сульфата аммония при 2°.

Техника. *Подготовка исследуемого материала.* Из раствора исследуемой пробы осаждают белки хлорной кислотой [2]. Можно также для инактивации ингибирующих ферментов прокипятить раствор при pH 6—6,5 в конической 12-миллилитровой центрифужной пробирке в течение 1 мин. Осажденный белок отцентрифуговывают. Аликвотную часть надосадочной жидкости берут для анализа.

Количество НАД-H_2 берется избыточное относительно количества седогептулозо-1,7-дифосфата, однако начальная экстинкция не должна быть слишком велика, так как это может повлиять на точность измерения изменений экстинкции. Удовлетворительные результаты дает концентрация 0,07 *мкмоля* НАД-H_2 в 1 *мл*, которая при длине волны 340 *ммк* обусловливает экстинкцию около 0,430. Время от времени следует проверять, окисляют ли взвеси обоих ферментов НАД-H_2 также и в отсутствие субстрата. Если это так, то в результате анализа необходимо вносить соответствующие исправления.

Постановка опыта. Измерение ведут при 340 *ммк*, толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 1,0 *мл*. Отмеривают пипеткой: в кювету главного опыта — 0,71 *мл* воды, 0,20 *мл* буферного раствора (1), 0,05 *мл* раствора НАД-H_2 (2), 0,02 *мл* раствора альдолазы (4) и 0,02 *мл* пробы; в кювету для сравнения: 0,73 *мл* воды, 0,20 *мл* буферного раствора (1), 0,05 *мл* раствора НАД-H_2 (2), 0,02 *мл* раствора альдолазы (4).

Несколько минут наблюдают и отмечают начальную экстинкцию E_1 обеих кювет против воды. Затем в обе кюветы отмеривают при

[1] КФ 1.1.99.5.
[2] Навеску ткани извлекают (8 объемами на 1 *г* веса ткани) хлорной кислотой.

помешивании 0,01 *мл* раствора ГДГ (3). Экстинкцию измеряют каждые 2—3 мин., пока она не станет постоянной (через 5—10 мин.).

Отмечают конечную экстинкцию E_2. Разницу $\Delta E_{пробы}$ и $\Delta E_{сравн}$ применяют для вычисления ($\Delta E = E_1 - E_2$).

Вычисление. В данных условиях происходит количественное превращение седогептулозо-1,7-дифосфата и диоксиацетонфосфата; поэтому 1 *мкмоль* окисленного НАД-H_2 соответствует 2 *мкмолям* седогептулозо-1,7-дифосфата. Тогда

$$\frac{\Delta E_{пробы} - \Delta E_{сравн}}{6,22 \cdot 0,02} = \textit{мкмолей} \text{ седогептулозы в 1 } \textit{мл} \text{ раствора пробы,}$$

где 6,22 — коэффициент экстинкции (*см²/мкмоль* для НАД-H_2 при 340 *ммк*); 0,02 — миллилитры раствора пробы в опыте.

Источники ошибок. Фруктозо-1,6-дифосфат в пробе следует определять отдельно при помощи НАД и глицеринальдегид-3-фосфатдегидрогеназы. Также рекомендуется поступать, если в пробе предполагают присутствие диоксиацетонфосфата, тогда наряду с кюветой опыта и сравнительной кюветой следует наполнить еще контрольную кювету раствором пробы, но без альдолазы. При вычислении тогда вычитают также $\Delta E_{контр}$ из $\Delta E_{пробы}$. Точность метода 2%.

Определение *D*-седогептулозо-1,7-дифосфата [6]

Принцип. Определение *D*-седогептулозо-1,7-дифосфата основывается на реакции:

D-седогептулозо-1,7-дифосфат → седогептулозо-7-фосфат + фосфат.

Реакция катализируется специфической седогептулозо-дифосфатазой из дрожжей. Определяют либо образовавшийся седогептулозо-7-фосфат ферментативно, либо неорганический фосфат колориметрически. Здесь описывается второй метод.

Реактивы: 1) трис-буферный раствор (1*М*, pH 7,2): 12,11 *г* трис-гидроксиметиламинометана растворяют в 50 *мл* дистиллированной воды, 5 н. раствором HCl доводят pH до 7,2, доливают дистиллированной водой до 100 *мл*; 2) трихлоруксусная кислота (10%-ный раствор в/о): 10 *г* трихлоруксусной кислоты растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*; 3) *D*-седогептулозо-1,7-дифосфат (СДФ) — стандартный раствор (7×10^{-3} *М* СДФ): 44,94 *г* соли бария растворяют в 5 *мл* дистиллированной воды, Ba^{2+} удаляют при помощи ионита Дауэкс-50 (Na^+ форма), доливают водой до 10 *мл*; 4) молибдат (около $2 \cdot 10^{-3}$ *М* раствор): 2,5 *г* $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ растворяют в 500 *мл* воды; разбавленную кислоту добавляют к раствору молибдата, доливают водой до 1000 *мл*; 5) восстанавливающий раствор: 5,7 *г* $NaHSO_3$ и 0,2 *г* Na_2SO_3 растворяют в воде, в этом растворе растворяют 0,1 *г* амино-2-нафтол-4-сульфоновой кислоты, доливают воду до 100 *мл*; 6) стандартный

раствор фосфата ($5 \cdot 10^{-4}$ *М*): 68 *мг* KH_2PO_4 растворяют в 500 *мл* воды, осторожно добавляют 10 *мл* концентрированной H_2SO_4, разбавляют водой до 1000 *мл*; 7) седогептулозо-1,7-дифосфатаза (6 *ед/мл*): ферментный препарат перед анализом разбавляют дистиллированной водой до требуемой концентрации.

Все растворы, кроме 3, 5 и 7, неограниченное время сохраняются при комнатной температуре. Стандартный раствор седогептулозо-1,7-дифосфата сохраняется при —20° несколько недель. Восстанавливающий раствор (5) хранят в небольших, доверху наполненных бутылях в темноте, при комнатной температуре. Содержимое начатой бутылки можно употреблять лишь одну неделю. Седогептулозо-1,7-дифосфатаза сохраняется при —20° несколько лет.

Техника. *Подготовка исследуемого материала.* Если *D*-седогептулозо-1,7-дифосфат определяют ферментативным способом, то исследуемый материал очищают от белков действием хлорной кислоты. Для определения неорганического фосфата белки осаждают после инкубации с трихлоруксусной кислотой.

Постановка опыта. Метод контролируют по крайней мере с одним стандартным опытом, содержащим известное количество СДФ. Отмеривают пипеткой в центрифужные пробирки: в главный опыт— 0,01 *мл* буферного раствора (1), 0,05 *мл* ферментного раствора (7), 0,01 *мл* пробы, дистиллированную воду до конечного объема — 0,1 *мл*; в контрольный опыт — дистиллированную воду до конечного объема 0,1 *мл*, 0,01 *мл* буферного раствора (1), 0,05 *мл* ферментного раствора (7), 0,01 *мл* пробы; в стандартный опыт —0,01 *мл* буферного раствора (1), 0,05 *мл* ферментного раствора (7), 0,01 *мл* стандартного раствора СДФ (3), дистиллированную воду до конечного объема 0,1 *мл*.

В контрольную пробу немедленно, а в остальные — через 30 мин. инкубации при 37° (на водяной бане), добавляют 0,1 *мл* раствора трихлоруксусной кислоты (2), центрифугируют, осадки промывают каждый 0,5 *мл* дистиллированной воды и вновь центрифугируют; надосадочные жидкости соединяют, осадки выбрасывают.

Определение фосфата. Содержание фосфата в надосадочной жидкости определяют колориметрически. Измерение ведут при 660 или 700 *ммк*. В пробирку с главным опытом, контрольным и стандартным отмеривают по 0,7 *мл* раствора молибдата (4) и 0,15 *мл* надосадочной жидкости; в пробирку со стандартным раствором фосфата добавляют 0,7 *мл* раствора молибдата (4), 0,15 *мл* раствора фосфата (6). После того как загружены все пробирки, в каждую добавляют, помешивая, 0,15 *мл* восстанавливающего раствора (5) и отмечают время. Между отмериванием пипеткой раствора сульфита каждый раз следует оставлять столько времени, сколько нужно будет позднее для колориметрического измерения. Каждую пробу оставляют на 15, самое большее — на 60 мин. при комнатной температуре (для каждой пробирки между добавлением восстанавливающего раствора и колориметрическим измерением должен пройти одинаковый промежуток времени). Измеряют экстинкцию.

Вычисление. На 1 *мкмоль* *D*-седогептулозо-1,7-дифосфата образуется 1 *мкмоль* фосфата:

$$\frac{E_v - E_{ko}}{E_s} \cdot (p) \cdot 4{,}7 \text{ мкмоля седогептулозо-1,7-фосфата в пробе,}$$

где E_v — экстинкции раствора пробы опыта, E_{ko} — экстинкция раствора контрольного опыта, E_s — экстинкция стандартной пробы фосфата, (p) — *мкмоли* фосфата в стандартной пробе (здесь 0,08 *мкмоля*), 4,7 — перерасчет миллилитров надосадочной жидкости в пробе для определения фосфата на объем всей надосадочной жидкости. Точность метода 3%.

Определение *D*-седогептулозо-7-фосфата [7]

Принцип. Определение *D*-седогептулозо-7-фосфата основано на следующих реакциях:

фруктозо-1,6-дифосфат ⇄ глицеринальдегид-3-фосфат + + диоксиацетонфосфат; (1)

седогептулозо-7-фосфат + глицеринальдегид-3-фосфат ⇄ ⇄ фруктозо-6-фосфат + эритрозо-4-фосфат; (2)

фруктозо-6-фосфат ⇄ глюкозо-6-фосфат; (3)

глюкозо-6-фосфат + НАДФ ⇄ 6-фосфоглюконат + НАДФ-Н + H^+ (4)

Реакция (1) катализируется альдолазой [1], (2) — трансальдолазой [2], (3) — глюкозо-6-фосфатизомеразой [3] и (4) — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой (см. стр. 241). В присутствии избыточного количества глицеринальдегид-3-фосфата, который образуется в реакции (1) из фруктозо-1,6-дифосфата, *D*-седогептулозо-7-фосфат используется полностью. Если исследуемый материал не содержит 6-фосфоглюконата, на 1 *мкмоль* седогептулозо-7-фосфата образуется 1 *мкмоль* НАДФ-H_2.

Реактивы: 1) хлорная кислота (около 10% в/о раствор): 10 *мл* хлорной кислоты (уд. в. 1,67) разбавляют водой до 110 *мл*; 2) раствор едкого калия (1 н.): 5,6 *г* КОН растворяют в воде и доводят объем до 100 *мл*; 3) глицилглициновый буферный раствор (0,25 *М*, рН 7,4): 3,30 *г* глицилглицина растворяют примерно в 70 *мл* воды, добавлением 21 *мл* 0,2 н. раствора едкого натра доводят рН до 7,4 и доливают водой до 100 *мл*; 4) никотинамидадениндинуклеотидфосфат (0,007 *М* раствор НАДФ): 6 *мг* НАДФ-NaH_2 растворяют в воде до 1 *мл*; 5) фруктозо-1,6-дифосфат (0,04 *М* раствор ФДФ): около 162 *мг* ФДФ-Na_3H растворяют в воде и доводят

---

[1] КФ 4.1.2.7; 4.1.2.13.
[2] КФ 2.2.1.2.
[3] КФ 5.3.1.9. Глюкозофосфатизомераза.

объем до 10 *мл*; в зависимости от содержания воды и состава препарата для анализа приходится брать разное количество реактива; целесообразно заранее определять содержание ФДФ в применяемом препарате; 6) альдолаза (76 ед. в 1 *мл*): кристаллическую взвесь соответственно разбавляют водой; 7) глюкозо-6-фосфатизомераза (ГФИ) (10 ед. в 1 *мл*): взвесь соответственно разбавляют водой; 8) глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа—Г-6-ФДГ (15 ед. в 1 *мл*): взвесь разбавляют водой до требуемой концентрации; 9) трансальдолаза (15 ед. в 1 *мл*): взвесь соответственно разбавляют водой.

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа и альдолаза (в виде взвеси в растворе сульфата аммония) при 0° сохраняются несколько месяцев; глюкозо-6-фосфатизомераза может храниться несколько лет.

Растворы 4 и 5 сохраняют замороженными при —20°. Препараты трансальдолазы пригодны к употреблению свыше года при хранении в замороженном виде.

Техника. *Подготовка исследуемого материала.* Трихлоруксусная кислота ингибирует глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, поэтому для осаждения белков применяют хлорную кислоту.

Охлажденный исследуемый материал смешивают с таким же объемом раствора хлорной кислоты (1), центрифугируют на холоду и тотчас же нейтрализуют (до pH 7,0) заранее определенным количеством 1н. раствора КОН (2), оставляют на 15 мин. при 0°, отцентрифуговывают осадок хлората калия, аликвотную часть надосадочной жидкости берут для анализа.

Постановка опыта. Измерение ведут при 340 *ммк* в кварцевой микрокювете. Толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 1 *мл*. Измерение ведут против кюветы для сравнения. В кюветы главного опыта и в кювету для сравнения к аликвоте надосадочной жидкости (содержащей 0,01—0,08 *мкмоля* седогептулозо-7-фосфата) добавляют воду, чтобы довести конечный объем до 1 *мл*.

Последовательно отмеривают: в кюветы главного опыта — 0,1 *мл* буферного раствора (3), 0,05 *мл* раствора НАДФ (4), 0,05 *мл* раствора ФДФ (5), 0,05 *мл* раствора альдолазы (6), 0,03 *мл* раствора ГФИ (7); в кювету для сравнения помещают 0,1 *мл* буферного раствора (3), 0,05 *мл* воды, 0,05 *мл* раствора ФДФ (5), 0,05 *мл* раствора альдолазы (6), 0,03 *мл* раствора ГФИ (7); после этого содержимое кювет перемешивают и измеряют экстинкцию E_1, затем в обе кюветы вводят, помешивая, 0,02 *мл* раствора Г-6-ФДГ (8). Если в исследуемом материале предполагается наличие НАДФ, то в сравнительную кювету наливают вместо Г-6-ФДГ 0,02 *мл* воды. Наличие фруктозо- или глюкозо-6-фосфата в исследуемом материале вызывает повышение экстинкции (восстановление НАДФ). Ждут окончания реакции, измеряют экстинкцию E_2, затем в обе кюветы добавляют 0,02 *мл* раствора трансальдолазы (9), следят за абсорбцией и по окончании реакции измеряют экстинкцию E_3.

Вычисление. Увеличение экстинкции приблизительно на 6,22 соответствует восстановлению 1 *мкмоля* НАДФ. Содержание *D*-седогептулозо-7-фосфата в исследуемом материале вычисляют из

уравнения:

$$\frac{E_3 - 0{,}98 \cdot E_2}{6{,}22}$$ *мкмолей* седогептулозо-7-фосфата в 1 *мл* пробы,

где 0,98 — фактор поправки на разведение при добавлении раствора трансальдолазы.

Источники ошибок. Трихлоруксусная кислота ингибирует глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу. Пробы после осаждения белка хлорной кислотой следует анализировать как можно скорее. Их хранение приводит к более низким значениям для седогептулозо-7-фосфата.

Исследуемый материал не должен содержать глютатиона, так как окисленная форма его, вместе с глютатионредуктазой, которая очень часто находится в препарате глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, может снова окислить НАДФ-H_2. Точность метода 3%.

Определение *L*-сорбозо-6-фосфата [8]

Принцип. Определение *L*-сорбозо-6-фосфата основано на следующих реакциях:

L-сорбозо-6-фосфат + *D*-глицеринальдегид-3-фосфат ⇄
⇄ *D*-фруктозо-6-фосфат + *L*-глицеринальдегид-3-фосфат; (1)

D-фруктозо-6-фосфат ⇄ *D*-глюкозо-6-фосфат; (2)

D-глюкозо-6-фосфат + НАДФ$^+$ ⇄ 6-фосфоглюконат + НАДФ-H_2 + H^+ (3)

Реакция (1) катализируется трансальдолазой, (2) — фосфоглюкозоизомеразой (ФГИ), (3) — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой (Г-6-Ф-ДГ). Критерием является увеличение экстинкции НАДФ-H_2 при 340 *ммк*. В присутствии избыточного *D*-глицеринальдегид-3-фосфата все три реакции протекают до полного использования *L*-сорбозо-6-фосфата. Поскольку ни один из ферментных препаратов не содержит 6-фосфоглюконатдегидрогеназы, то на 1 *мкмоль* *L*-сорбозо-6-фосфата образуется 1 *мкмоль* НАДФ-H_2.

Реактивы: 1) глицилглициновый буферный раствор (0,25 *М*, pH 7,4): 3,30 *г* глицилглицина растворяют в 70 *мл* дистиллированной воды, доводят pH до 7,4 при помощи 0,2 н. раствора NaOH и доливают дистиллированной водой до 100 *мл*; 2) никотинамидадениндинуклеотидфосфат ($5 \cdot 10^{-3}$ *М* раствор НАДФ): 22 *мг* НАДФ-NaH_2 растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 5 *мл*; 3) 50 *мг* *DL*-глицеринальдегид-3-фосфатдиэтилацетат-Ва-соли добавляют к взвеси дауэкс-50 (H^+ форма), содержащей около 500 *мг* в 3 *мл* воды, 3 мин. держат при встряхивании в кипящей водяной бане; раствор сливают с ионита; содержание *D*-ГАФ определяют ферментативно; раствор разбавляют дистиллированной водой до 0,02 *М* ГАФ; 4) глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, Г-6-Ф-ДГ (10 *ед/мл*): торговый препарат соответственно разводят дистиллированной водой; 5) фосфоглюкозоизомераза, ФГИ (10 *ед/мл*); 6) трансальдолаза

6,8 *ед/мл*: торговый препарат соответственно разбавляют дистиллированной водой.

Все растворы, кроме 4 и 5, сохраняют при —20°. 1-6-Ф-ДГ и ФГИ сохраняются несколько месяцев или даже лет в растворе $(NH_4)_2SO_4$ при 0°. Трансальдолазу можно хранить в виде кристаллической взвеси в растворе сульфата аммония несколько месяцев при 0°. Частично очищенные препараты сохраняют при —20°.

Техника. *Осаждение белков* (см. определение седогептулозо-7-фосфата).

Постановка опыта. Измерение ведут против сравнительной кюветы при 340 *ммк*; толщина слоя 1 *см*, объем измеряемой жидкости 1 *мл*. Отмеривают пипеткой: в кювету опыта — очищенную от белков пробу (содержащую 0,01—0,08 *мкмоля* *L*-сорбозо-6-фосфата), дистиллированную воду — до конечного объема 1 *мл*, 0,1 *мл* буферного раствора (1), 0,1 *мл* раствора НАДФ (2), 0,05 *мл* раствора глицеринальдегид-3-фосфата (3); в сравнительную кювету — очищенную от белков пробу (как и в кювете опыта), дистиллированную воду (как в кювете опыта), 0,1 *мл* буферного раствора (1), 0,05 *мл* раствора глицеринальдегид-3-фосфата (3).

Измеряют экстинкцию E_1. Затем в обе кюветы отмеривают пипеткой 0,02 *мл* раствора Г-6-Ф-ДГ (4). Если очищенная от белков проба содержит НАДФ, то в сравнительную кювету добавляют дистиллированную воду вместо раствора фермента. После прекращения реакции измеряют экстинкцию E_2. В обе кюветы добавляют, помешивая, 0,02 *мл* раствора ФГИ (5); измеряют E_3, добавляют 0,02 *мл* реактива (6) и после прекращения реакции измеряют экстинкцию E_4.

Вычисление. $\Delta E_{Г\text{-}6\text{-}Ф} = E_2 - E_1$ является показателем содержания глюкозо-6-фосфата в пробе; $\Delta E_{Ф\text{-}6\text{-}Ф} = E_3 - E_2$ — показатель содержания фруктозо-6-фосфата, а из $\Delta E_{С\text{-}6\ Ф}$ вычисляют содержание сорбозо-6-фосфата; экстинкции E_1 и E_3 следует поправлять, чтобы учесть разведение вследствие добавления растворов фермента.

Получают:

$$\frac{E_2 - 0{,}98E_1}{6{,}22}$$ *мкмолей* *D*-глюкозо-6-фосфата в пробе;

$$\frac{E_3 - 0{,}98E_2}{6{,}22}$$ *мкмолей* *D*-фруктозо-6-фосфата в пробе;

$$\frac{E_4 - 0{,}98E_3}{6{,}22}$$ *мкмолей* *L*-сорбозо-6-фосфата в пробе;

6,22 — коэффициент экстинкции для НАДФ-H_2 при длине волны 340 *ммк* (*см*^{2}/*мкмоль*). Точность метода 1,5%.

Определение *D*-фруктозо-1,6-дифосфата [9]

Принцип. Определение фруктозо-1,6-дифосфата основывается на следующих реакциях:

фруктозо-1,6-дифосфат → фруктозо-6-фосфат + фосфат; (1)

фруктозо-6-фосфат ⇄ глюкозо-6-фосфат; (2)

глюкозо-6-фосфат + НАДФ ⇄ 6-фосфоглюконат + НАДФ-Н + H^+ (3)

Реакции катализируются: (1) — специфической фруктозо-1,6-дифосфатазой, (2) — фосфоглюкозоизомеразой (ФГИ), (3) — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой (Г-6-ФДГ). Если анализ не должен быть очень чувствительным, то довольствуются реакцией (1) и колориметрически определяют неорганический фосфат. Если для анализа используются все три реакции, то в качестве величины измерения служит увеличение экстинкции НАДФ-H_2 при длине волны 340 *ммк*. На 1 *мкмоль* фруктозо-6-дифосфата образуется 1 *мкмоль* НАДФ-H_2.

Реактивы: 1) хлорная кислота (50% в/о): 43 *мл* 70%-ной кислоты разбавляют дистиллированной водой до 100 *мл*; 2) трис-буферный раствор (1 *М*, pH 8,8): 12,1 *г* трис-гидроксиметиламинометана растворяют в 50 *мл* дистиллированной воды, добавлением 17 *мл* 1н. раствора HCl доводят pH до 8,8 и доливают дистиллированную воду до 100 *мл*; 3) хлористый магний (0,1 *М* раствор): 2,03 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*; 4) этилендиаминтетраацетат (1,2%-ный раствор в/о): 1,2 *г* ЭДТА растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*; 5) никотинамидадениндинуклеотидфосфат (0,005 *М* раствор НАДФ); 6) глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа Г-6-ФДГ (15 *ед/мл*): продажный препарат разбавляют дистиллированной водой до требуемой концентрации; 7) фосфоглюкозоизомераза — ФГИ (10 *ед/мл*): торговый препарат разбавляют дистиллированной водой; 8) фруктозо-1,6-дифосфатаза: препарат, изготовленный по [6], разбавляют дистиллированной водой до 70 *ед/мл*.

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа в виде взвеси в растворе сульфата аммония сохраняется при 0° несколько месяцев. Глюкозо-6-фосфатизомеразу в виде взвеси в растворе сульфата аммония можно хранить при 0° в течение нескольких лет. Фруктозо-1,6-дифосфатаза при —20° сохраняется несколько лет.

Техника. *Подготовка исследуемого материала*. Трихлоруксусная кислота ингибирует глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу. Поэтому ее нельзя применять для осаждения белков. Пробу нагревают 2 мин. в водяной бане при 100° или добавляют столько раствора хлорной кислоты, чтобы концентрация раствора $HClO_4$ в освобожденной от белков пробе составляла 5% в/о. Белок отцентрифуговывают, pH надосадочной жидкости приводят к 7,0 добавлением 5 н. раствора KOH, оставляют на 10 мин. в ледяной бане; выпавший $KClO_4$ отцентрифуговывают. Аликвоту надосадочной жидкости применяют для анализа.

Постановка опыта. Измерение ведут при 340 *ммк*; толщина слоя 1 *см*, объем жидкости 1 *мл*. Отмеривают пипеткой: в кювету опыта — свободную от белка пробу (содержащую 0,01—0,08 *мкмоля* фруктозо-1,6-дифосфата), 0,1 *мл* буферного раствора (2), 0,05 *мл* $MgCl_2$ (3), 0,05 *мл* раствора ЭДТА (4) и дистиллированную воду — до конечного объема 1 *мл*; в контрольную кювету — свободную от белка пробу (как в кювете опыта), 0,1 *мл* буферного раствора (2), 0,05 *мл* раствора $MgCl_2$ (3), 0,05 *мл* раствора ЭДТА (4), дистиллированную

воду — до конечного объема 1 *мл*; затем добавляют только в кювету опыта — 0,05 *мл* раствора НАДФ (5).

Измеряют экстинкцию E_1. В обе кюветы (если проба, свободная от белка, содержит НАДФ, то только в кювету опыта) прибавляют 0,02 *мл* раствора Г-6-ФДГ. Перемешивают, после прекращения реакции измеряют экстинкцию E_2.

Затем в обе кюветы прибавляют 0,2 *мл* раствора ФГИ (7), перемешивают, выжидают наступления постоянной экстинкции, измеряют экстинкцию E_3. Потом в обе кюветы добавляют по 0,02 *мл* раствора фруктозо-1,6-дифосфатазы (8). После перемешивания измеряют экстинкцию E_4.

Вычисление. $\Delta E_{Г\text{-}6\text{-}Ф} = E_2 - E_1$ соответствует содержанию глюкозо-6-фосфата в пробе опыта; $\Delta E_{Ф\text{-}6\text{-}Ф} = E_3 - E_2$ соответствует содержанию фруктозо-6-фосфата; $\Delta E_{Ф\text{-}1,6\text{-}Ф} = E_4 - E_3$ соответствует содержанию фруктозо-1,6-дифосфата; экстинкции $E_1 - E_3$ следует всегда поправлять на разведение, вследствие добавления раствора фермента, так, чтобы:

$$\frac{E_3 - 0{,}98 \cdot E_1}{6{,}22} = \text{мкмолей глюкозо-6-фосфата в пробе опыта;}$$

$$\frac{E_4 - 0{,}98 \cdot E_2}{6{,}22} = \text{мкмолей фруктозо-6-фосфата в пробе опыта;}$$

$$\frac{E_4 - 0{,}98 \cdot E_3}{6{,}22} = \text{мкмолей фруктозо-1,6-дифосфата в пробе опыта;}$$

6,22 — коэффициент экстинкции НАДФ-H_2 при длине волны 340 *ммк* (*см*^{2}/*мкмоль*).

Источники ошибок. Пробы, очищенные от белка при помощи хлорной кислоты, следует анализировать, по возможности, скорее. Глютатион не должен содержаться в пробе (ни в качестве GS—SG, ни как G—SH), иначе НАДФ-H_2 окисляется глютатионредуктазой, которая встречается в большинстве торговых препаратов глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [1]. Точность метода 3%.

Определение D-глюкозо-1-фосфата [10]

Принцип. Глюкозо-1-фосфат (Г-1-Ф)[2] превращается фосфоглюкомутазой[3] в глюкозо-6-фосфат:

$$\text{Глюкозо-1-фосфат} \rightleftarrows \text{глюкозо-6-фосфат (Г-6-Ф)} \qquad (1)$$

Г-6-Ф окисляется НАДФ с глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой в 6-фосфоглюконат с образованием НАДФ-H_2.

$$\text{глюкозо-6-фосфат} + \text{НАДФ}^+ \rightleftarrows \text{6-фосфоглюконат} + \text{НАДФ-Н} + \text{Н}^+ \qquad (2)$$

[1] КФ 1.1.1.49.
[2] G. Cori et al. J. Biol. Chem., 1938, **123**, 375.
[3] КФ 2.7.51.

Количество образовавшегося НАДФ-H_2 измеряют по экстинкции при 366 или 340 *ммк*. Количество образовавшегося НАДФ-H_2 прямо пропорционально количеству Г-1-Ф, так как реакция (2) практически протекает полностью.

Реактивы (чтобы подавить рост микроорганизмов, следует предварительно пропарить посуду): 1) триэтаноламиновый буферный раствор (0,5 *M*, pH 7,6): 9,3 *г* триэтаноламингидрохлорида растворяют в 22 *мл* н. раствора NaOH и доливают бидистиллированной водой до 1000 *мл*; контролируют значение pH (со стеклянным электродом); 2) хлористый магний (0,1 *M* раствор): 2,03 *г* $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ растворяют в бидистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*; 3) этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) (около 0,02 *M* раствор): 50 *мг* ЭДТА-$NaH_2 \cdot 2H_2O$ растворяют в бидистиллированной воде и дополняют до 10 *мл*; 4) никотинамидадениндинуклеотидфосфат (около 0,012 *M* раствор НАДФ): 10 *мг* НАДФ-NaH_2 растворяют в 1 *мл* бидистиллированной воды; 5) глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (см. стр. 658)—Г-6-ФДГ (1 *мг* белка на 1 *мл*): основную взвесь[1] разводят соответственно 3,2 *M* раствором сульфата аммония; 6) фосфоглюкомутаза (см. стр. 659) (2 *мг* белка на 1 *мл*): основную взвесь соответственно разводят 2,5 *M* раствором сульфата аммония.

Все растворы и взвеси сохраняются закупоренными в холодильнике при 0—4° по меньшей мере несколько недель.

Техника. *Подготовка исследуемого материала.* Этот метод до сих пор применялся только в водных растворах для определения чистоты препаратов Г-1-Ф и Г-6-Ф. С биологическим материалом еще нет опыта (см. «Источники ошибок»).

Постановка опыта. Измерение ведут при 366 или 340 *ммк*. Толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 3,0 *мл*, температура комнатная. Измерение ведут против кюветы пустого опыта.

Последовательно отмеривают пипеткой в кюветы: для пустого опыта — 2,88 *мл* буферного раствора (1), 0,02 *мл* пробы; для основного опыта — 2,78 *мл* буферного раствора (1), 0,10 *мл* раствора $MgCl_2$ (2), 0,10 *мл* ЭДТА (3), 0,05 *мл* раствора НАДФ (4), 0,02 *мл* пробы.

Хорошо смешивают уплощенной внизу стеклянной или пластмассовой палочкой и измеряют экстинкцию E_1. Вводят, помешивая, 0,02 *мл* взвеси Г-6-ФДГ (5) и ждут окончания реакции. Можно ожидать увеличения экстинкции благодаря содержащемуся в пробе Г-6-Ф, соответственно уравнению (1). Измеряют экстинкцию E_2.

Затем вводят, помешивая, 0,02 *мл* взвеси ФГМ (6) и следят за увеличением экстинкции до прекращения реакции. Измеряют конечную экстинкцию E_3:

$$E_2 - E_1 = \Delta E_{\text{Г-6-Ф}}$$
$$E_3 - E_2 = \Delta E_{\text{Г-1-Ф}}$$

Эти значения входят в вычисление.

[1] Получение см.: J. Cooper et al. Arch. Bioch. Bioph., 1958, 74, 306.

Вычисление. Для содержимого кюветы в 3,0 *мл*:

при 340 *ммк* $\frac{\Delta E_{\text{Г-1-Ф}} \cdot 3{,}0}{6{,}22}$ = *мкмолям* Г-1-Ф в пробе;

при 366 *ммк*: $\frac{\Delta E_{\text{Г-1-Ф}} \cdot 3{,}0}{3{,}3}$ = *мкмолям* Г-1-Ф в пробе;

мкмоль Г-1-Ф·260 = *мкг* Г-1-Ф.

Чтобы получить содержание Г-1-Ф в миллилитрах исследуемого раствора, следует (если берут 0,02 *мл* неразведенного раствора) умножить результат на 50. Для вычисления количества Г-6-Ф в пробе следует применять те же формулы, однако ввиду меньшего объема опыта (см. выше, вычисление) $\Delta E_{\text{Г-6-Ф}}$ надо прежде умножить на 2,98/3,00.

Источники ошибок. Недостаточная чистота примененных ферментов может привести к ложным значениям, если исследуемый раствор содержит, например, фосфоглюконат, глюкозу, фруктозу, АТФ или фруктозо-6-фосфат. Случается, что при большом количестве фруктозо-6-фосфата реакция до и после добавления ФГМ не вполне прекращается. Тогда следует экстраполировать на момент добавления ФГМ и, таким образом, получить $\Delta E_{\text{Г-1-Ф}}$.

Применяя метод на биологическом материале, например на гомогенатах тканей, надо, наверное, работать по методу «замораживания», так как, из-за высокой активности фосфатаз и ФГМ, Г-1-Ф быстро переводится в глюкозу или Г-6-Ф.

Реакция, соответствующая уравнению (1), специфична для глюкозо-1-фосфата. Превращение Г-1-Ф в Г-6-Ф происходит через глюкозо-1,6-дифосфат. Если исследуемый раствор не содержит глюкозо-1,6-дифосфата, то реакция, соответствующая уравнению (1), требует времени разгона около 2 мин., в течение которых в первую очередь образуются требуемые каталитические количества глюкозо-1,6-дифосфата. Точность метода (в чистых растворах) 1,5%.

Определение *D*-эритрозо-4-фосфата [11]

Принцип. Определение *D*-эритрозо-4-фосфата основывается на следующих реакциях:

эритрозо-4-фосфат + фруктозо-6-фосфат ⇄ седогептулозо-7-фосфат + + глицеринальдегид-3-фосфат; (1)

глицеринальдегид-3-фосфат ⇄ диоксиацетонфосфат; (2)

диоксиацетонфосфат + НАД-Н + H^+ → → α-глицерофосфат + $НАД^+$ (3)

Реакция (1) катализируется трансальдолазой (см. [2], стр. 204), (2) — триозофосфатизомеразой (см. стр. 660) и (3) — α-глицерофосфатдегидрогеназой [1]. В условиях описанного ниже метода восстановле-

[1] КФ 1.1.99.5.

ние диоксиацетонфосфата практически является количественным. В присутствии избыточного количества фруктозо-6-фосфата на 1 *моль* эритрозо-4-фосфата окисляется 1 *моль* НАД-H_2.

Реактивы: 1) трихлоруксусная кислота (10%-ный раствор в/о): 10 *г* трихлоруксусной кислоты растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*; 2) карбонат калия (около 5 *М* раствор): около 69 *г* K_2CO_3 растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*; 3) глицилглициновый буферный раствор (0,25 *М*, рН 7,4); 4) восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (около 0,004 *М* раствор НАД-H_2, рН 9): 7 *мг* НАД-Н-Na_2 растворяют в 2 *мл* дистиллированной воды, значение рН доводят раствором КОН примерно до 9; 5) фруктозо-6-фосфат (0,006 *М* раствор Ф-6-Ф); взвешивают в зависимости от содержания Ф-6-Ф в препарате; например, для препарата с 75% Ф-6-Ф-Ва 31,64 *мг* соли растворяют примерно в 5 *мл* дистиллированной воды; затем посредством ионита (Na^+-форма) удаляют барий, затем раствор, свободный от Ba^{2+}, доливают дистиллированной водой до 100 *мл*; 6) триозофосфатизомераза/α-глицерофосфатдегидрогеназа [1], ТФИ/ГДГ (500 *мкг* белка на 1 *мл*): 0,1 *мл* смешанной кристаллической взвеси фермента в 2,8 *М* растворе сульфата аммония разводят глицилглициновым буферным раствором (0,001 *М*, рН 7,4) до 0,4 *мл*; 7) трансальдолаза (15 *ед/мл*): препарат трансальдолазы из пекарских дрожжей [2], изготовленный с глицилглициновым буферным раствором (3), разводят соответствующим образом (см. [1]).

Все реактивы, кроме 6, хранят при —20°. Раствор НАД-H_2 сохраняется несколько недель. Взвесь триозофосфатизомеразы /α-глицерофосфатдегидрогеназы разводят лишь в день определения, неиспользованную разведенную взвесь выбрасывают.

Техника. *Подготовка исследуемого материала.* Исследуемый материал очищают от белков трихлоруксусной кислотой (конечная концентрация 5% в/о) и центрифугируют. Аликвоту надосадочной жидкости нейтрализуют раствором K_2CO_3 до рН 7,0 (контроль стеклянным электродом).

Постановка опыта. Измерение ведут при 340 *ммк*. Толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 1 *мл*. Измерение ведут против сравнительной кюветы.

В две кварцевые кюветы помещают столько воды, чтобы конечный объем опыта составлял 1 *мл*. Затем добавляют: в кювету опыта — нейтрализованную надосадочную жидкость, содержащую 0,01—0,06 *мкмоля* эритрозо-4-фосфата (0,1—0,2 *мл*), 0,1 *мл* буферного раствора (3), 0,03 *мл* раствора НАД-H_2 (4), 0,05 *мл* раствора фруктозо-6-фосфата (5); в сравнительную кювету — 0,1 *мл* буферного раствора (3), 0,03 *мл* дистиллированной воды, 0,05 *мл* фруктозо-6-фосфата (5) и дистиллированную воду до 1 *мл*.

---

[1] См. стр. 659.
[2] D. Couri a. E. Racker. Arch. Bioch. Bioph., 1959, 83, 195.

Измеряют экстинкцию E_1 при длине волны 340 *ммк*. В обе кюветы вносят по 0,02 *мл* взвеси ТФИ/ГДГ (6). Ожидают окончания реакции, измеряют экстинкцию E_2 при 340 *ммк*. Уменьшение экстинкции $E_1 - E_2$ соответствует содержанию триозофосфата в исследуемом материале. Затем в обе кюветы добавляют по 0,02 *мл* раствора трансальдолазы (7). По окончании реакции измеряют экстинкцию E_3 при 340 *ммк*.

Вычисление. Уменьшение экстинкции на 6,22 соответствует окислению 1 *мкмоля* НАД-H_2. Содержание эритрозо-4-фосфата в опыте вычисляют по формуле

$$\frac{0{,}98E_2 - E_3}{6{,}22}$$ *мкмолей* эритрозо-4-фосфата на 1 *мл* опыта;

фактор 0,98 является поправкой на 2%-ное разведение при добавлении раствора трансальдолазы.

Источники ошибок. Загрязнения фруктозо-6-фосфата могут ингибировать определение, но их влияние можно учесть посредством вычислений (если они незначительны). Ацетальдегид в исследуемом материале мешает, если препарат трансальдолазы содержит алкогольдегидрогеназу. Контрольные опыты в отсутствие триозофосфатизомеразы [1]/α-глицерофосфатдегидрогеназы дают значения, которыми можно поправить результат определения при незначительном содержании альдегида в исследуемом материале. Точность метода 2%.

Определение *D*-рибозо-5-фосфата [12]

Принцип. В присутствии рибозо-5-фосфатизомеразы и ксилулозо-5-фосфатэпимеразы рибозо-5-фосфат превращается в рибулозо-5-фосфат и далее — в ксилулозо-5-фосфат:

$$\text{рибозо-5-Ф} \underset{}{\overset{\text{рибозо-5-Ф-изомераза}}{\rightleftarrows}} \text{рибулозо-5-Ф} \overset{\text{ксилулозо-5-Ф-эпимераза}}{\rightleftarrows} \text{ксилулозо-5-Ф}$$

Ксилулозо-5-фосфат после превращения в глицеринальдегид-3-фосфат может быть определен ферментативно:

$$\text{ксилулозо-5-Ф} + \text{рибозо-5-Ф} \overset{\text{транскетолаза}}{\rightleftarrows} \text{глицеринальдегид-3-ф} + \text{седогептулозо-7-Ф}.$$

Акцептор—альдегидрибозо-5-фосфат здесь не должен добавляться со стороны, так как он уже имеется в качестве анализируемого вещества в пробе. Таким образом, на 1 *моль* рибозо-5-фосфата получают только 0,5 *моля* глицеринальдегид-3-фосфата.

Так как этим методом определяется также рибулозо-5-фосфат и ксилулозо-5-фосфат, то оба эти вещества следует удалить из про-

[1] КФ 5.3.1.1.

бы обработкой ее 1 н. раствором едкого натра. Незначительные потери (10%) рибозо-5-фосфата остаются при этой предварительной обработке в пределах ошибок всего анализа. Детали обработки см. [12].

Р е а к т и в ы: см. определение ксилулозо-5-фосфата (стр. 256), кроме того: 10) рибозо-5-фосфатизомераза (100 *ед/мл*): основную взвесь разбавляют дистиллированной водой; 11) взвесь, содержащая 200 *ед/мл* ксилулозо-5-фосфатэпимеразы [1].

Т е х н и к а. *Подготовка исследуемого материала.* Пробу очищают от белков, как и при определении ксилулозо-5-фосфата (см. стр. 256). Осаждают белки, центрифугат нейтрализуют, прибавляют 1 *мл* 1 н. раствора NaOH для того, чтобы удалить следы кетопентозофосфатов. Аликвоту нейтрализованного раствора (содержащую 0,02—0,16 *мкмоля* рибозо-5-фосфата) применяют для анализа.

Постановка опыта. Измерение ведут при 340 *ммк*. Толщина слоя 10 *мм*, объем анализируемой жидкости 1 *мл*. Растворы, как описано при определении ксилулозо-5-фосфата, отмеривают пипеткой в кювету опыта и сравнительную кювету, однако раствор рибозо-5-фосфата оставляют стоять без перемешивания, а раствор транскетолазы перед добавлением очищенной от белка пробы помешивают. После добавления анализируемой пробы объем опыта должен составлять 0,98 *мл*. Если обработка щелочью была проведена правильно, то проба не содержит глицеринальдегид-3-фосфата и ксилулозо-5-фосфата; поэтому происходят и изменения экстинкции. В обе кюветы добавляют, помешивая, по 0,01 *мл* раствора ксилулозо-5-фосфатэпимеразы (11) и 0,01 *мл* рибозо-5-фосфатизомеразы (10). Измеряют экстинкцию, пока реакция не закончится.

Вычисление. 1 *молем* рибозо-5-фосфата восстанавливается 0,5 *моля* НАД. Увеличение экстинкции на 6,22 соответствует восстановлению 1 *мкмоля* НАД. Из увеличения экстинкции ΔE вычисляют содержание рибозо-5-фосфата в опыте по формуле:

$$\frac{\Delta E}{3,11} = \text{\textit{мкмолям} рибозо-5-фосфата в 1 \textit{мл} пробы опыта.}$$

И с т о ч н и к и о ш и б о к. Источники ошибок, описанные при определении ксилулозо-5-фосфата и рибулозо-5-фосфата, могут быть отмечены и здесь. Кроме того, препарат рибозо-5-фосфатизомеразы может содержать изредка следы фосфатазы, гидролизующей рибозо-5-фосфат. Точность метода 3%.

Определение *D*-рибулозо-1,5-дифосфата [14]

П р и н ц и п. Определение рибулозодифосфата основано на следующих реакциях:

$$\text{рибулозодифосфат} + CO_2 \rightarrow \text{3-фосфоглицерат;} \qquad (1)$$

$$\text{3-фосфоглицерат} + \text{АТФ} \rightleftarrows \text{1,3-дифосфоглицерат} + \text{АДФ;} \qquad (2)$$

[1] Единицей фермента считают то количество его, которое в течение 1 минуты превращает 1 *мкмоль* субстрата. Получение фермента см.: M. T a b a c h n i c k et al. Arch. Bioch. Bioph., 1958, 74, 315.

$$1,3\text{-дифосфоглицерат} + \text{НАД-Н} + H^+ \rightleftarrows \text{глицеринальдегид-3-фосфат} + \text{фосфат} + \text{НАД}^+; \quad (3)$$

$$\text{глицеринальдегид-3-фосфат} \rightleftarrows \text{диоксиацетонфосфат}; \quad (4)$$

$$\text{диоксиацетонфосфат} + \text{НАД-Н} + H^+ \rightleftarrows \alpha\text{-глицерофосфат} + \text{НАД}^+. \quad (5)$$

Реакция (1) катализируется рибулозофосфаткарбоксилазой, (2) — фосфоглицераткиназой, (3) — глицериназьдегид-3-фосфатдегидрогеназой, (4) — триозофосфатизомеразой и (5) — α-глицерофосфатдегидрогеназой.

Так как необратимое расщепление рибулозодифосфата дает 2 молекулы 3-фосфоглицерата и при практически количественно протекающей реакции превращения 1 молекулы 3-фосфоглицерата в α-глицерофосфат окисляются 2 молекулы НАД-H_2, то для превращения 1 *моля* рибулозодифосфата требуется 4 *моля* НАД-H_2.

Р е а к т и в ы: 1) трис-буферный раствор (1 *М*, pH 7,4): 12,11 *г* трис-гидроксиметиламинометана растворяют примерно в 50 *мл* дистиллированной воды, устанавливают pH 7,4, добавляя 40 *мл* 2 н. раствора HCl, и доливают дистиллированной водой до 100 *мл* (проверяют значение pH стеклянным электродом); 2) аденозинтрифосфат (0,1 *М* раствор АТФ): 121 *мг* АТФ-$Na_2H_2 \cdot 3H_2O$ растворяют в 2 *мл* дистиллированной воды; 3) хлорид магния (0,1 *М* раствор): 203 *мг* $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ растворяют в 10 *мл* дистиллированной воды; 4) восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (около 0,004 *М* раствор НАД-H_2, pH 9): 7 *мг* НАД-Н-Na_2 растворяют в 2 *мл* дистиллированной воды, доводят щелочью до pH 9; 5) триозофосфатизомераза/α-глицерофосфатдегидрогеназа, ТФИ/ГДГ (500 *мкг* белка на 1 *мл*): 0,1 *мл* кристаллической взвеси перед употреблением разбавляют трис-буферным раствором (1) до 0,4 *мл*; 6) глицеринальдегид-3-фосфатдегидрогеназа фосфоглицераткиназа, ГАФДГ/ФГК: взвесь глицеринальдегид-3-фосфатдегидрогеназы и взвесь фосфоглицераткиназы до употребления разбавляют, в соответствии с их активностью, 0,005 *М* раствором ЭДТА (pH 7,4) до 500 *ед/мл*; разведенные взвеси смешивают 1 : 1; 7) рибулозодифосфаткарбоксилаза (40 *ед/мл*): раствор разбавляют трис-буфером (1), в котором имеется 0,002 *М* ЭДТА, до 40 *ед/мл*.

Раствор НАД-H_2 в замороженном состоянии сохраняется несколько недель. Торговые препараты фермента хранят в виде неразведенных взвесей, при 2°. Они сохраняются в таком виде несколько месяцев. Препараты рибулозодифосфаткарбоксилазы обычно не очень стабильны, однако препарат, изготовленный как указано для раствора (3), можно сохранять несколько месяцев при 2°.

Т е х н и к а. *Постановка опыта.* Экстинкцию определяют при 340 *ммк*. Толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 1 *мл*. Измерение ведут против контрольной кюветы. В две кварцевые кюветы наливают столько дистиллированной воды, чтобы конечный объем опыта составлял 1 *мл*. Затем добавляют: в кювету опыта —

нейтраллизованный раствор исследуемого материала, содержащий 0,003—0,02 *мкмоля* рибулозодифосфата, 0,1 *мл* буферного раствора (1), 0,05 *мл* раствора АТФ (2), 0,05 *мл* раствора $MgCl_2$ (3), 0,03 *мл* раствора НАД-H_2 (4), 0,05 *мл* взвеси ТФИ/ГДГ (5); в контрольную кювету — дистиллированную воду, 0,1 *мл* буферного раствора (1), 0,05 *мл* раствора АТФ (2), 0,05 *мл* раствора $MgCl_2$ (3), 0,03 *мл* дистиллированной воды, 0,05 *мл* взвеси ТФИ/ГДГ.

Измеряют экстинкцию E_1 при 340 *ммк*, затем в обе кюветы добавляют по 0,02 *мл* взвеси ГАФДГ/ФГК (6). После окончания реакции измеряют экстинкцию E_2. Уменьшение экстинкции $E_1 - E_2$ соответствует содержанию 3-фосфоглицерата в исследуемом материале. Затем в обе кюветы добавляют по 0,02 *мл* раствора рибулозодифосфаткарбоксилазы (7) и (после окончания реакции) измеряют экстинкцию E_3 (также при 340 *ммк*).

Вычисление. Уменьшение экстинкции на 6,22 соответствует окислению 1 *мкмоля* НАД-H_2. На 1 *моль* рибулозодифосфата используются 4 *моля* НАД-H_2. Содержание рибулозодифосфата в опыте поэтому вычисляется по формуле

$$\frac{0{,}98E_2 - E_3}{4 \cdot 6{,}22} = \text{мкмолям рибулозодифосфата в 1 мл опыта;}$$

0,98 — фактор поправки, вносимой при прибавлении 0,02 *мл* раствора рибулозодифосфаткарбоксилазы.

Источники ошибок. Упомянутые выше загрязнения, которые могут содержаться в торговых препаратах АТФ, значительно нарушают реакцию. Рибулозодифосфаткарбоксилаза должна быть совершенно свободной от фосфорибонуклеазы и рибозо-5-фосфатизомеразы. В противном случае наряду с рибулозодифосфатом определяются одновременно рибозо-5-фосфат и рибулозо-5-фосфат. Точность метода 3%.

Определение *D*-рибулозо-5-фосфата [15]

Принцип. Определение рибулозо-5-фосфата основано на образовании из него ксилулозо-5-фосфата в присутствии ксилулозо-5-фосфатэпимеразы. Ксилулозо-5-фосфат определяют посредством транскетолазы. Анализ рибулозо-5-фосфата можно проводить в том же опыте, который служил для определения глицеринальдегид-3-фосфата и ксилулозо-5-фосфата. Если объем раствора ксилулозо-5-фосфата небольшой (0,01 *мл*), то не требуется даже поправки на разведение уже имеющегося количества.

Реактивы: см. стр. 256 — определение ксилулозо-5-фосфата; кроме того: 10) ксилулозо-5-фосфатэпимераза (200 *ед/мл*): изготовленный из мышцы кролика лиофилизированный ферментный препарат растворяют в дистиллированной воде до 200 *ед/мл*.

Ферментный лиофилизированный препарат ксилулозо-5-фосфатэпимеразы сохраняется при 0° в эксикаторе над кизельгуром несколько месяцев. Концентрированные растворы фермента в дистил-

лированной воде сохраняются при −20° 2—3 недели, однако постепенно утрачивают свою активность.

Техника. *Постановка опыта* (см. стр. 256 — определение ксилулозо-5-фосфата). После добавления взвеси транскетолазы ждут прекращения реакции (3—5 мин.) и измеряют экстинкцию при 340 *ммк*. Затем в кювету опыта и сравнительную кювету наливают по 0,01 *мл* раствора ксилулозо-5-фосфатэпимеразы (10). Реакция заканчивается приблизительно через 15 мин. Измеряют экстинкцию при 340 *ммк*.

Сумма ксилулозо-5-фосфата и рибулозо-5-фосфата в опыте не должна превышать 0,1 *мкмоля*. В противном случае количество акцептора альдегида (рибозо-5-фосфата) будет недостаточным.

Вычисление. По изменению экстинкции ΔE после добавления ксилулозо-5-фосфатэпимеразы вычисляется содержание рибулозо-5-фосфата в опыте по формуле:

$$\frac{\Delta E}{6{,}22} = \text{мкмолям рибулозо-5-фосфата в опыте.}$$

Источники ошибок. Ксилулозо-5 фосфатэпимераза практически не должна содержать ни рибозо-5-фосфатизомеразу, ни α-глицерофосфатдегидрогеназу. Если в исследуемом материале встречается пируват, то в препарате эпимеразы не должно содержаться лактикодегидрогеназы [1]. В противном случае исследуемый материал следует обработать до начала определения пентозофосфата лактикодегидрогеназой и небольшим избытком НАД-H_2 [15]. Так как и в сравнительную кювету попадает аликвота исследуемого материала, то на избыток НАД-H_2 не требуется поправки. В присутствии больших количеств глицеринальдегид-3-фосфатдегидрогеназы рибозо-5-фосфат медленно восстанавливает НАД. Однако содержание в опыте глицеринальдегид-3-фосфатдегидрогеназы для этого недостаточно. При тщательном соблюдении всех условий точность метода может быть доведена до 2%.

Определение *D*-ксилулозо-5-фосфата [16]

Принцип. Определение ксилулозо-5-фосфата основывается на следующих реакциях:

$$\text{ксилулозо-5-фосфат} + \text{рибозо-5-фосфат} \rightleftarrows \text{седогептулозо-7-фосфат} + \text{глицеринальдегид-3-фосфат}; \quad (1)$$

$$\text{глицеринальдегид-3-фосфат} + \text{НАД}^+ \xrightarrow{\text{арсенат}} \text{3-фосфоглицерат} + \text{НАД-Н} + \text{H}^+. \quad (2)$$

Реакция (1) катализируется транскетолазой, реакция (2) — глицеринальдегид-3-фосфатдегидрогеназой [2]. Образовавшийся в пер-

[1] КФ 1.1.1.27.
[2] КФ 1.2.1.9.

вой реакции глицеринальдегид-3-фосфат в присутствии арсената окисляется количественно в 3-фосфоглицерат, причем образуется эквивалентное количество восстановленного никотинамидадениндинуклеотида. С избыточным рибозо-5-фосфатом в качестве акцептора альдегида это количество НАД-H_2 эквивалентно содержащемуся в пробе ксилулозо-5-фосфату.

Реактивы (все растворы изготовляются на бидистиллированной воде и, если нужно, нейтрализуются перед употреблением; тиаминпирофосфат и $MgCl_2$ растворяют вместе; если предстоит анализировать много проб, то можно изготовить готовую смесь из первых шести компонентов, входящих в реакцию): 1) глицилглициновый буферный раствор (0,25 *М*, рН 7,4): 3,30 *г* глицилглицина растворяют примерно в 70 *мл* воды, затем доводят при помощи 21 *мл* 0,2 н. раствора NaOH значение рН до 7,4 (стеклянный электрод); 2) хлорид магния (0,3 *М* раствор), тиаминпирофосфат (0,5%-ный раствор в/о): 610 *мг* $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ и 50 *мг* тиаминпирофосфата растворяют в воде и доводят объем до 10 *мл*; 3) арсенат натрия (0,09 *М* раствор): 380 *мг* $Na_3AsO_4 \cdot 12H_2O$ растворяют в воде и доводят объем до 10 *мл*; 4) 10 *г* трихлоруксусной кислоты растворяют в бидистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*; 5) бикарбонат натрия (1 *М* раствор): 8,4 *г* $NaHCO_3$ растворяют в воде и доводят объем до 100 *мл*; 6) никотинамидадениндинуклеотид (0,1 *М* раствор НАД): 78 *мг* НАД растворяют в 1 *мл* воды; 7) рибозо-5-фосфат (0,0015 *М* раствор Р-5-Ф): 54,83 *мг* соли бария рибозо-5-фосфата, соответственно 34,5 *мг* рибозо-5-фосфорной кислоты (учитывать содержание препарата!), освобождают при помощи ионообменника или раствором $(NH_4)_2SO_4$ от бария. Раствор доливают водой до 100 *мл*; 8) глицеринальдегид-3-фосфатдегидрогеназа (см. стр. 658), ГАФДГ, около 2,5 *мг* белка на 1 *мл* = 64 *ед/мл*: основную взвесь центрифугируют, кристаллический осадок растворяют в 0,002 *М* растворе ЭДТА (рН 7,4) примерно до 2,5 *мг/мл*; 9) транскетолаза [1] (около 0,5 *мг* белка на 1 *мл* = 10 *ед/мл*): основную взвесь центрифугируют, кристаллический осадок растворяют в глицилглициновом (1) буферном растворе примерно до 0,5 *мг/мл*.

Чтобы предотвратить рост бактерий, все растворы, за исключением обоих растворов фермента, сохраняют при —20°. Рибозо-5-фосфат в растворе и при —20° медленно образует кетопентозофосфаты, которые должны быть удалены. Концентрации кетопентозофосфатов до 1% можно не учитывать. Растворы фермента сохраняют при —2°. ГАФДГ можно употреблять по крайней мере в течение года, даже когда специфическая активность понижается до половины. Транскетолаза остается стабильной в течение нескольких лет. После хранения более одного года фермент часто становится нерастворимым в воде, но его снова можно растворить в смеси тиаминпирофосфата и $MgCl_2$ (количество то же, что и в опыте).

---

[1] КФ 2.2.1.1.

Т е х н и к а. *Подготовка исследуемого материала.* Пробу, анализируемую на ксилулозо-5-фосфат (1 *мл*), очищают от белков, приливая 1 *мл* раствора трихлоруксусной кислоты (4), и центрифугируют. Часть надосадочной жидкости нейтрализуют раствором бикарбоната натрия (5). Аликвоту этой пробы, содержащей 0,01—0,08 *мкмоля* ксилулозо-5-фосфата, берут для измерения.

Постановка опыта. Измерение ведут при 340 *ммк.* Толщина слоя 1 *см*, объем измеряемой жидкости 1 *мл.* Измерение ведут против сравнительной кюветы.

В кварцевые микрокюветы отмеривают пипеткой столько воды, чтобы конечный объем опыта составлял 1,00 *мл.* Затем в кюветы отмеривают пипеткой: 0,10 *мл* глицилглицинового (1) буферного раствора, 0,02 *мл* раствора $MgCl_2$ и тиаминпирофосфата (2), 0,05 *мл* раствора арсената натрия (3), 0,03 *мл* раствора НАД (6) — только в кювету опыта, 0,10 *мл* раствора рибозо-5-фосфата (7), 0,05 *мл* ГАФДГ (8).

Если в пробе можно ожидать наличия НАД, то ГАФДГ следует давать только в кювету опыта. Экстинкцию E_1 измеряют при 340 *ммк.* После этого в обе кюветы добавляют анализируемый безбелковый раствор и измеряют экстинкцию E_2. Разница экстинкции $E_2 - E_1$ пропорциональна содержанию глицеринальдегид-3-фосфата в пробе. После прекращения реакции в обе кюветы приливают по 0,03 *мл* раствора транскетолазы (9); по окончании реакции измеряют экстинкцию E_3 при 340 *ммк.*

Вычисление. Если проба не содержит глицеринальдегид-3-фосфата, то разница $E_3 - E_2$ может быть использована для определения содержания ксилулозо-5-фосфата в опыте. Если проба содержит глицеринальдегид-3-фосфат, то уже в присутствии транскетолазы образуется НАД-H_2; экстинкция E_2 добавлением 0,03 *мл* взвеси транскетолазы понижается тогда приблизительно на 3%. На эту величину $\Delta E_{тр}$ следует тогда поправить разницу $E_3 - E_2$. Увеличение экстинкции на 6,22 соответствует восстановлению 1 *мкмоля* НАД. Если проба не содержит глицеринальдегид-3-фосфата, то содержание ксилулозо-5-фосфата равно

$$\frac{E_3 - E_2}{6,22} \text{ мкмолей на 1 мл опыта.}$$

Если проба содержит глицеринальдегид-3-фосфат, то 1 *мкмоль* ксилулозо-5-фосфата на 1 *мл* опыта равен

$$\frac{E_3 - E_2 + \Delta E_{тр}}{6,22}.$$

И с т о ч н и к и о ш и б о к. Даже после семикратной перекристаллизации ГАФДГ еще может содержать следы лактатдегидрогеназы (ЛДГ), которая повторно окисляет НАД-H_2 в присутствии пирувата.

Таким образом, если исследуемый материал содержит пируват, то следует применить свободную от ЛДГ ГАФДГ (например, из пе-

карских дрожжей), так как в противном случае получают слишком низкие значения ксилулозо-5-фосфата. Нарушения узнают по непостоянству экстинкции после прекращения реакции, так же как и по отсутствию пропорциональности между образованием НАД-H_2 и объемом пробы. Точность метода 3%.

Определение аденозин-5'-трифосфата

Определение посредством фосфоглицераткиназы[1] [17]

Принцип. Фосфоглицераткиназа (ФГК) катализирует реакцию

$$\text{3-фосфоглицерат} + \text{АТФ} \underset{}{\overset{\text{ФГК, } Mg^{2+}}{\rightleftarrows}} \text{1,3-дифосфоглицерат} + \text{АДФ}. \qquad (1)$$

Образовавшийся 1,3-дифосфоглицерат восстанавливают никотинамидадениндинуклеотидом (НАД-H_2) в присутствии глицеринальдегидфосфатдегидрогеназы (ГАФДГ). Возникает глицериальдегид-3-фосфат, который входит в реакцию как гидразон: индикаторная реакция:

$$\text{1,3-дифосфоглицерат} + \text{НАД-Н} + H^+ \overset{\text{ГАФДГ}}{\rightleftarrows} \text{глицерин-альдегид-3-фосфат} + \text{НАД}^+ + \text{фосфат}; \qquad (2)$$

$$\text{глицерин-альдегид-3-фосфат} + \text{гидразин} \rightarrow \text{глицерин-альдегид-3-фосфат-гидразон}. \qquad (3)$$

Реакция 1 протекает слева направо в 8,8 раза медленнее, чем справа налево. Равновесие реакции (2) сдвинуто на 65% вправо, что благоприятствует образованию 1,3-дифосфоглицерата (особенно при насыщении фосфоглицераткиназы 3-фосфоглицератом).

Реактивы: 1) триэтаноламин-буфер ($5 \cdot 10^{-2}$ *М* раствор, pH 7,55): 7,46 *г* триэтаноламина разбавляют приблизительно 700 *мл* бидистиллированной воды, содержащей около 15 *мл* 2 н. раствора HCl, доводят pH до 7,55, дополняют бидистиллированной водой до 1000 *мл*; 2) сульфат магния (0,5 *М* раствор): 12,3 *г* $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ растворяют в бидистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*; 3) этилендиамин-тетраацетат (100 *мг/мл*): 10 *г* ЭДТА-$Na_2H_2 \cdot 2H_2O$ растворяют в бидистиллированной воде, нейтрализуют 2 н. раствором NaOH, дополняют бидистиллированной водой до 100 *мл*; 4) гидразин (0,1 *М* раствор): 1,30 *г* сульфата гидразина растворяют в бидистиллированной воде, нейтрализуют 2 н. раствором NaOH до pH 7,0, дополняют бидистиллированной водой до 100 *мл* (ежедневно приготовляют заново!); 5) 3-фосфоглицериновая кислота (около 5×10^{-2} *М* раствор): 200 *мг* барий-3-фосфоглицерата $\cdot 2H_2O$ растворяют приблизительно в 2 *мл* 2 н. раствора HCl; для удаления Ba^{2+}

---

[1] КФ 2.7.2.3.

добавляют 2 *мл* 2 н. раствора H_2SO_4, хорошо перемешивают, центрифугируют 10 мин. при 3000 *об/мин*, осадок $BaSO_4$ промывают 1 *мл* бидистиллированной воды, объединенные надосадочные жидкости доводят посредством 4 *мл* 2 н. раствора NaOH до pH 6,5 и дополняют бидистиллированной водой до 10 *мл*. Содержание 3-ФГ в растворе определяют ферментативно; 6) восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (около 10^{-2} *M* раствор НАД-H_2): 20 *мг* НАД-HNa_2 растворяют в 2 *мл* бидистиллированной воды. Содержание НАД-H_2 в растворе определяют ферментативно[1]; 7) аденозинфосфат (около 10^{-2} *M* раствор): 10 *мг* АТФ - $Na_2H \cdot 3H_2O$ растворяют в 2 *мл* бидистиллированной воды; 8) глицеринальдегидфосфатдегидрогеназа[2], ГАФДГ (10 *мг* белка на 1 *мл*): 0,1 *мл* кристаллической суспензии (10 *мг* белка на 1 *мл*) центрифугируют, надосадочную жидкость отсасывают капилляром и отбрасывают. Осадок (отстой) растворяют в 100 *мл* следующего буфера (pH 7,5): 2,23 *г* $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$ и 1,655 *мл* 2 н. раствора HCl (растворяют в бидистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*); из этого раствора ежедневно заново берут 1 *мл*, в котором растворяют 3,07 *мг* глютатиона (GSH); 9) фосфоглицераткиназа, ФГК (2 *мг* белка на 1 *мл*): 0,1 *мл* суспензии фермента (10 *мг* белка на 1 *мл*) центрифугируют, надосадочную жидкость отсасывают капилляром. Осадок растворяют до 0,5 *мл* в ледяной бидистиллированной воде; 10) хлорная кислота: а) 0,9 н. раствор: 7,7 *мл* хлорной кислоты разбавляют бидистиллированной водой до 100 *мл*; б) 0,2 н. раствор: 1,7 *мл* хлорной кислоты разбавляют бидистиллированной водой до 100 *мл*.

Раствор ФГК устойчив лишь несколько часов без большой потери активности. Сильно разбавленные водные растворы приблизительно с 10 *мг* фермента через 3 часа обнаруживают уже незначительную активность (25%). В основной смеси ФГК практически насыщен своим субстратом 3-ФГ и поэтому стабилизирован. Раствор ГАФДГ (8) должен ежедневно приготовляться заново. НАД-H_2 в водном растворе в замороженном состоянии сохраняется около 14 дней; после оттаивания его необходимо использовать в течение дня. Все остальные растворы хранят в холодильнике; они устойчивы в течение месяцев.

Техника. *Подготовка исследуемого материала*. Ферментативная активность исследуемого биологического материала должна быть приостановлена как можно скорее. При изменениях физиологического состояния изменение содержания АТФ может произойти за доли секунды. Цельную кровь прямо из иголки шприца капают в кислоту; органический материал замораживают in situ в сильно охлажденных металлических блоках соответственной формы и ве-

---

[1] H. Holzer et al. Hoppe-Seylers. Z. Physiol. Chem., 1958, **313**, 184.
[2] Получение фермента см. G. Beisenherz et al. Z. Naturforsch., 1963, 8b, 555.

личины (50.20.8 *мм*^{3}), откладывают до использования, сохраняют при температуре ниже —30° [1].

Размельчение фиксированной ткани, перевод в экстракционную жидкость и денатурирование белка производят в самое короткое время: очень быстро отделяют от клеточных суспензий на холоде, так же быстро вносят замороженную ткань в кислоту (для гомогенизации), заранее растирая в сильно охлажденной ступке таким образом, чтобы частицы ткани, вступающие во взаимодействие с холодной кислотой, сейчас же размалывались и инактивировались.

При исследовании адениловой кислоты в тканях, содержащих контрактильный миозин или другие высокоактивные АТФ, поступают, как указано в сноске [1].

В замороженном состоянии порошок ткани (1 часть по весу) и кислоту (2 части по весу) взвешивают, размешивают в сильно охлажденной ступке и растирают. Смесь порошка оставляют на ледяной ацетоновой бане в течение 2 час., доводя t° от —18 до 0° для оттаивания. Затем гомогенизируют и центрифугируют 10 мин. при +2° и 3000 *g*. Осадок экстрагируют 0,2 н. раствором хлорной кислоты (раствор 10, б) (треть объема, используемого для первой экстракции), объединенные надосадочные жидкости медленно нейтрализуют 2 н. раствором КОН или 3,75 *М* раствором K_2CO_3 (так лучше для вязких экстрактов) до pH 6,0—6,5 при тщательном, быстром помешивании. Нельзя даже краткосрочно повышать значение pH. Оставляют 1 час на льду и удаляют выпавший осадок $KClO_4$.

Постановка опыта. Измерение ведут при 340 или 366 *ммк*; толщина слоя 10 *мм*, объем анализируемой жидкости 2,00 *мл*, температура комнатная.

Непосредственно перед употреблением готовят следующую реакционную смесь: 0,012 *мл* раствора сульфата магния (2): 0,040 *мл* раствора ЭДТА (3); 0,024 *мл* раствора гидразина (4); 0,040 *мл* раствора 3-ФГ (5); 0,020 *мл* раствора НАД-H_2 (6) или кратные количества отдельных объемов.

В кюветы последовательно вносят пипеткой безбелковую пробу. экстракт (1 *мл*), 0,136 *мл* реакционной смеси и буфер (1) до 2,00 *мл*, пользуясь уплощенной книзу стеклянной палочкой, добавляют 0,012 *мл* раствора ГАФДГ (8) и отсчитывают экстинкцию E_1. Затем вливают 0,020 *мл* раствора ФГК (9) и в течение 5—8 мин. вплоть до окончания реакции отсчитывают убыль экстинкции (E_2). Для контроля добавляют 0,020 *мл* раствора АТФ (7). Реакция при этом должна тотчас же возобновиться. Убыль экстинкции $E_1 - E_2 = \Delta E$ входит в вычисление.

---

[1] Вообще рекомендуется работать в холодильной камере. Металлические блоки, снабженные деревянными ручками, предварительно охлаждают в жидком воздухе. На один из них кладут исследуемый орган (например, печень), держа его двумя пинцетами, и придавливают вторым блоком. Замороженный кусок печени отрезают со всех сторон от остальной части органа, и держа этот кусочек зажатым между блоками, бросают его в предварительно замороженную фарфоровую ступку. Здесь его часто «поливают» жидким воздухом и растирают в порошок. Нельзя допускать, чтобы ткань при этом оттаивала.

Вычисление. Коэффициент экстинкции для НАД-H_2 (при 25°): $\varepsilon_{340} = 6{,}29 \cdot 10^6$ (*см²/моль*); $\varepsilon_{366} = 3{,}30 \cdot 10^6$ (*см²/моль*).

$$\frac{\Delta E \cdot V_A \cdot V_E}{\varepsilon \cdot d \cdot V_p} = \text{количеству } \textit{мкмолей} \text{ АТФ в общем объеме экстракта,}$$

где $\Delta E = E_1 - E_2$, V_A — объем анализируемой смеси в кювете (2,0 *мл*), V_E — объем всей пробы, V_p — объем части пробы, содержащейся в кювете, ε — коэффициент экстинкции, d — толщина слоя (1 *см*).

Для измерения при длине волны 366 *ммк*:

$$\frac{\Delta E \cdot 2 \cdot V_E}{3{,}30 \cdot 1 \cdot V_p} = \Delta E \cdot 0{,}606 \, \frac{V_E}{V_p} = \textit{мкмолям} \text{ АТФ во всей пробе.}$$

Если это значение разделить на вес взятой ткани, то получается количество *мкмолей* АТФ на 1 *г* ткани.

Результаты воспроизводимы в пределах обычных средних ошибок от ± 1,5% и близки к результатам анализов спектрофотометрическим методом.

Чувствительность метода можно повысить, используя микрокюветы, что делает возможным определение нескольких 10^{-9} *молей* АТФ.

Определение посредством гексокиназы[1] *и «цвишенфермента» (промежуточного фермента)* [*18*]

Принцип. Гексокиназа фосфорилирует глюкозу при помощи АТФ в присутствии Mg^{2+} в глюкозо-6-фосфат (Г-6-Ф). Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (промежуточный фермент) катализирует дегидрирование Г-6-Ф никотинамидадениндинуклеотидфосфатом (НАДФ).

$$\text{Глюкоза} + \text{АТФ} \rightleftarrows \text{глюкозо-6-фосфат} + \text{АДФ}; \qquad (1)$$

$$\text{глюкозо-6-фосфат} + \text{НАДФ}^+ \rightleftarrows \text{6-фосфоглюконовая кислота-}\delta\text{-лактон} + \text{НАДФ-Н} + \text{H}^+. \qquad (2)$$

Таким образом, на 1 *моль* АТФ образуется 1 *моль* НАДФ-H_2. Гексокиназа при соответствующей концентрации глюкозы и Mg^{2+} практически количественно превращает АТФ; при насыщении субстратом в минуту этерифицируются 13 000 *молей* глюкозы на 10^5 *г* фермента (при 30°, pH 7,5).

Реактивы (приблизительно для 20 определений; все растворы готовят на свежеприготовленной бидистиллированной воде): 1) триэтаноламин-буфер (0,05 *М* раствор; pH 7,5—7,6): 4,65 *г* гид-

[1] КФ 2.7.1.1.

рохлорида триэтаноламина растворяют примерно в 200 *мл* воды, добавляют 11 *мл* 1 н. раствора едкого натра, после чего дополняют водой до 500 *мл*; 2) примерно $7 \cdot 10^{-3}$ *М* раствор НАДФ: 7,5 *мг* НАДФ-NaH_2 растворяют в воде до общего объема 1,5 *мл*; 3) хлорид магния (0,1 *М* раствор): 2,03 *г* $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, растворяют в воде и доводят объем до 100 *мл*; 4) глюкоза (0,5 *М* раствор): 9,91 *г* глюкозы ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$) растворяют в воде и доводят объем до 100 *мл*; 5) промежуточный фермент ПФ: а) смотря по специфической активности, 15—20 *мг* лиофилизированного фермента растворяют в 1 *мл* воды; б) (200 *мкг* белка на 1 *мл*): 0,3 *мл* взвеси фермента (1 *мг*/*мл* в 3,3 *М* раствора сульфата аммония) разбавляют водой до 1,5 *мл*; 6) гексокиназа, ГК (примерно 10—15 *мг* белка на 1 *мл*): в зависимости от специфической активности 20—30 *мг* лиофилизированного фермента растворяют в 2,0 *мл* воды; 7) хлорная кислота (около 6% в/раствора): 5,2 *мл* $HClO_4$, х. ч. (плотностью 1,67), разбавляют водой до 150 *мл* или 6,6 *мл* $HClO_4$ (плотностью 1,53), разбавляют водой до 150 *мл*; 8) карбонат калия (около 5 *М* раствор K_2CO_3): примерно 72 *г* K_2CO_3 растворяют в воде и доводят объем до 100 *мл*. 9) индикатор метилоранж: около 50 *мг* растворяют в 100 *мл* воды.

Все растворы сохраняют в закупоренных склянках в холодильнике при 1—4°. Растворы фермента из сухого порошка готовят ежедневно, растворы НАДФ и глюкозы — еженедельно, каждые 2—3 дня заново готовят разбавленную водой взвесь фермента.

Техника. *Подготовка исследуемого материала* (см. определении пировиноградной кислоты, стр. 197). Плазма не содержит АТФ, так как АТФ крови локализован в эритроцитах, гексозомонофосфаты редко встречаются в цельной крови (крысы). При определениях АТФ в тканях необходимо мгновенно замораживать пробы тканей (в доли секунды). Для этого пригодны сосуды из алюминиевых (или из другого легкого металла) блоков, которые охлаждаются жидким воздухом. Точность результатов анализа зависит от быстроты, с которой работают при экстирпации органов и других манипуляций при взятии пробы (эфирный наркоз, декапитация, быстрота замораживания и т. д.).

Для осаждения белков исследуемый материал соединяют с хлорной кислотой так, чтобы совокупный объем жидкости пробы относился к ее первоначальному весу, как 4 : 1. Количество кислоты зависит от содержания воды в пробе. Если изменить соотношение хлорная кислота : кровь = 4 : 1, это отразится на результатах анализа.

Пример. Для осаждения белков цельную кровь соединяют с хлорной кислотой в соотношении 1 : 1 (о/о) и центрифугируют в течение 10 мин. при 3000 *об/мин* при 2° (надосадочная жидкость I). Студенистый, оставшийся в большом количестве кровяной сгусток удерживает варьирующие количества АТФ; трехкратное промывание студенистого сгустка по 4 *мл* 5%-ного раствора хлорной кислоты, гомогенизация и центрифугирование дают надосадочные жидкости II—IV. Приводим количество АТФ в надосадочных

жидкостях в *мг%*:

I	8,[illegible]
II	6,75
III	2,50
IV	0,79
Итого . . .	18,39

Если же анализировать только надосадочную жидкость I, то в перерасчете на цельную кровь содержание АТФ составит 16,7 *мг%*.

Если анализируют дрожжи, то необходимо учитывать, что при осаждении белков хлорной или трихлоруксусной кислотой дрожжевые клетки расщепляются неполностью. В этом случае расщепление клеток производят в стаканах емкостью 30 *мл* со стеклянными бусинками.

20 *мл* 5,4%-ной дрожжевой суспензии (отпрессованные свежие дрожжи) помещают пипеткой в смесь из 2,0 *мл* 60%-ной хлорной кислоты и 20 *мл* бусинок, охлажденную ледяной водой в гомогенизаторных пробирках. Сейчас же сильно помешивают и гомогенизируют 30 сек. при 4000 *об/мин* без дальнейшего охлаждения (температура гомогената через 30 сек. примерно равна 12°); затем центрифугируют примерно при 4000 *g* (на холоде).

При анализе органов или тканей на 2 *г* замороженной (см. сноску на стр. 261) пробы берут 6,5 *мл* хлорной кислоты: V_1 (*г* ткани) + + *г* $HClO_4 = V_2$. Экстракт центрифугируют. Аликвоту (2—4 *мл*) $= V_3$ нейтрализуют (индикатор метилоранж) и доводят pH до 7,4 добавлением 5 *M* раствора K_2CO_3 (V_3 + *мл* раствора $K_2CO_3 = V_4$). Ставят на 10 мин. в ледяную воду, сливают с осадка и 0,1 или 0,2 *мл* жидкости ($= V_5$) тотчас анализируют.

Измерение ведут при 366 *ммк*; толщина слоя 2 *см*, объем анализируемой жидкости при определении АТФ 5,00 *мл*, при определении гексозомонофосфата или глюкозо-6-фосфата — 4,53 *мл*.

Растворы вносят пипеткой в кюветы в нижеприводимой последовательности. Через 1—3 мин. отсчитывают по установлении постоянства значения начальную экстинкцию E_1. Указанные количества фермента вводят в кювету опыта маленькой пластмассовой ложкой. После первой добавки фермента (0,02 *мл* раствора промежуточного фермента) через 5 мин. отсчитывают конечную экстинкцию E_2 и добавляют в кювету остальные 0,02 *мл* раствора промежуточного фермента. Через 1 мин. контролируют E_3.

Разность экстинкций $E_3 - E_2$, или «скачок экстинкции» $\Delta E_{пф}$, который обусловлен прибавлением промежуточного фермента, вычитают из разности $E_2 - E_1 = E_{ГМФ}$. Разность $(E_2 - E_1) - (E_3 - E_2) = E_{ГМФ} - E_{пф} = \Delta E_{ГМФ}$ является разностью экстинкции, соответствующей содержанию гексозомонофосфата или глюкозо-6-фосфата.

После прибавления раствора глюкозы измеряют незначительную убыль экстинкции, вызванную разбавлением опытного раство-

Раствор	Кювета опыта *, мл		Значения экстинкции E после изменения ΔE
	1	2	
Буферный (1)	4,00	3,90	
НАДФ (2)	0,06	0,06	
$MgCl_2$ (2)	0,35	0,35	
Очищенный от белка	0,10	0,20	3 мин. E_1
Промежуточный фермент (5) .	0,02	0,02	5 мин. E_2 (E_1, E_2 → $E_{ГМФ}$; $E_{ГМФ}$, $E_{ЦФ}$ → $\Delta E_{ГМФ}$)
Промежуточный фермент (5) .	0,02	0,02	1 мин. E_3 (E_2, E_3 → $E_{ЦФ}$)
Глюкоза (4)	0,40	0,40	0,5 мин. E_4 (E_3, E_4 → $E_{глюк}$)
Гексокиназа * (6)	0,05	0,05	15 мин. E_5 ($E_{АТФ}$; $E_{АТФ}$, $E_{ГК}$ → $\Delta E_{АТФ}$)
Гексокиназа (6)	0,05	0,05	1 мин. E_6 (E_5, E_6 → $E_{ГК}$)

* См. стр. 264.

ра спустя 30 сек.: $E_4 \cdot 0{,}05$ *мл* раствора гексокиназы начинают реакцию АТФ, которая заканчивается примерно за 12 мин. Изменение экстинкции контролируют в течение 15 мин. (конечное значение E_5). Дальнейшие 0,05 *мл* раствора гексокиназы служат для установления «скачка гексокиназы»; через 1 мин. после прибавления фермента измеряют E_6. $E_6 - E_5 = E_{ГК}$, вычисляют по разности $E_5 - E_4 = E_{АТФ}$:

$$(E_5 - E_4) - (E_6 - E_5) = E_{АТФ} - E_{ГК} = \Delta E_{АТФ}.$$

Величины $\Delta E_{ГМФ}$ и $\Delta E_{АТФ}$ входят в вычисление.

Вычисление. Реакции протекают при данных условиях стехиометрически, двойные количества стандартного безбелкового раствора обусловливают (в пределах точности измерения) двойные величины $\Delta E_{ГМФ}$ и $\Delta E_{АТФ}$. На этом основании содержание АТФ и ГМФ вычисляют следующим образом.

Если $V_к$ — конечный объем в кювете после последнего прибавления фермента, *мл*;

V_1 — вес (*г*) или объем (*мл*) ткани,

V_2 — вес или объем ткани + *г* (*мл*) хлорной кислоты, необходимой для осаждения белков,

V_3 — объем экстракта хлорнокислого перед нейтрализацией, *мл*,

$V_4 = V_3 +$ *мл* затраченного на нейтрализацию $HClO_4$ раствора K_2CO_3,

V_5 — объем безбелкового раствора в кювете,

ε — коэффициент экстинкции НАДФ-H_2; $\varepsilon_{366} = 3{,}3$ *см²/мкмоль*,

d — толщина слоя, *см*,

то

$$\frac{\Delta E_{АТФ}\cdot V_k\cdot V_2\cdot V_4}{\varepsilon\cdot d\cdot V_1\cdot V_3\cdot V_5} = \textit{мкмолям}\ \text{АТФ}/\textit{г}\ \text{или}\ \textit{мл}\ \text{органа;} \qquad (3)$$

$$\frac{\Delta E_{ГМФ}\cdot V_k\cdot V_2\cdot V_4}{\varepsilon\cdot d\cdot V_1\cdot V_3\cdot V_5} = \textit{мкмолям}\ \text{гексозомонофосфата}/\textit{г}\ \text{или}\ \textit{мл}\ \text{органа.} \qquad (4)$$

Если содержание АТФ берут на 1 *г* органа, то и V_1 и V_2 дают в граммах. Для 6%-ного раствора хлорной кислоты действительно: 1 *мл* = 1,035 *г*. Таким образом, V_2 (*г*) = V_1 (*г*) + *мл* хлорной кислоты·1,035.

Если содержание АТФ относят к 1 *мл* органа, то V_1 и V_2 выражают в *мл*. Вес органа, деленный на удельный вес органа, составляет V_1 (*мл*); эта величина входит в V_2 (*мл*).

Если содержание вместо *мкмолей* дано в *мкг*, то умножают на молекулярный вес АТФ (507,2) или Г-6-Ф (260,2).

Поправки. Чтобы найти содержание АТФ в клетках ткани, из общего содержания АТФ в ткани вычитают содержащееся в ее крови количество АТФ. Для этой поправки действительно следующее отношение:

Содержание АТФ клеток=[(общее содержание АТФ ткани) — (весовая часть крови в ткани × содержание АТФ в крови)]: (1 весовая часть крови в ткани). (5)

Такого рода расчет может быть использован и для других метаболитов.

Весовую долю крови в ткани определяют, пользуясь результатами измерений экстинкций при 578 и 540 *ммк*. Можно допустить, что содержание оксигемоглобина (HbO_2) крови в кровяном депо и в ткани приблизительно одинаково. Если примем за x весовую долю крови в ткани, то:

$$x = \frac{\Delta E_{HbO_2}\cdot \text{разбавление}\cdot d_1}{\Delta E'_{HbO_2}\cdot \text{разбавление}\cdot d_2}\cdot 100\ (\text{вес. }\%), \qquad (6)$$

где ΔE_{HbO_2} — разность экстинкции экстракта ткани, $\Delta E'_{HbO_2}$ — разность экстинкции на разведение крови, d_1 и d_2 — толщина слоя в кювете.

ΔE_{HbO_2} и $\Delta E'_{HbO_2}$ вычисляют без применения графического метода оценки из измерений экстинкции при 578, 560 и 540 *ммк*:

$$\Delta E_{HbO_2}\ \text{или}\ \Delta E'_{HbO_2} = (E_{578} - E_{560}) + [(E_{540} - E_{578})\cdot 0{,}47]. \qquad (7)$$

Пример. В 2,8035 *г* печени крысы осаждают белки добавлением 9,10 *мл* раствора хлорной кислоты (7). На каждые 4,0 *мл* экстракта хлорной кислоты использовали 0,14 *мл* раствора K_2CO_3 (8). V_1 = 2,8035 *г*; V_2 = 2,8035 + (9,10·1,035) = 12,222 *г*; V_3 = 4,0 *мл*; V_4 = 4,14 *мл*; V_5 = 0,1 и 0,2 *мл*.

Величины экстинкций:

для $V_5 = 0{,}1$ *мл*; для $V_5 = 0{,}2$ *мл*;

E_1 0,041 \
E_2 0,071 / → $E_{ГМФ}$ \
$E_{ЦФ}$ / → $\Delta E_{ГМФ} = 0{,}028$ [$\Delta E_{ГМФ} = 0{,}054$]

E_3 0,073 \
E_4 0,072 / → $E_{глюк.}$

E_4 0,072 \
E_5 0,150 / → $E_{АТФ}$ \
E_5 0,150 \
E_6 0,156 / → $E_{ГК}$ / → $\Delta E_{АТФ} = 0{,}072$ [$\Delta E_{АТФ} = 0{,}42$]

Вставляя значения этих величин в уравнения (3) и (4), получают следующее:

2,458 *мкмоля* АТФ на 1 *г* печени ($V_5 = 0{,}1$ *мл*);
2,424 *мкмоля* АТФ на 1 *г* печени ($V_5 = 0{,}2$ *мл*);
0,879 *мкмоля* гексозомонофосфат на 1 *г* печени ($V_5 = 0{,}1$ *мл*);
0,848 *мкмоля* гексозомонофосфат на 1 *г* печени ($V_5 = 0{,}1$ *мл*).

Определение АТФ в цельной крови крыс. На 2,0 *г* крови израсходовано 6,4 *мл* раствора хлорной кислоты. Количество крови составляло 3,5485 *г*; таким образом, нужно добавить 3,15 *мл* хлорной кислоты. На 4,0 *мл* отцентрифугированного хлорнокислого экстракта израсходовано 0,14 *мл* 5 *М* раствора K_2CO_3. $V_5 = 0{,}1$ *мл* или 0,2 *мл*.

Получены следующие разности экстинкции:

для $V_5 = 0{,}1$ *мл*: $\Delta E_{АТФ} = 0{,}015$, $\Delta E_{ГМФ} = 0$; для $V_5 = 0{,}2$ *мл*; $\Delta E_{АТФ} = 0{,}030$; $\Delta E_{ГМФ} = 0$. Из этого вычисляют: 0,518 *мкмоля* АТФ в 1 *г* крови.

Содержание крови в печени таких же животных. Разбавление пробы крови 1 : 125, разбавление пробы печени 1 : 12,5; все измерения проводят в кюветах с толщиной слоя 10 *мм*.

Экстинкции, полученные при 578, 560 и 540 *ммк*, дают по уравнению (7) для крови $\Delta E'_{HbO_2} = 0{,}237$, для печени $\Delta E_{HbO_2} = 0{,}168$.

По уравнению (6) содержание крови в печени равно

$$x = \frac{0{,}168 \cdot 12{,}5 \cdot 10}{0{,}237 \cdot 125 \cdot 10} \cdot 100 = 7{,}1\,\%.$$

Поправки на содержание АТФ в крови:

Корректурная формула уравнения (5) дает следующие значения содержания АТФ:

$$\frac{2{,}458 - (0{,}071 \cdot 0{,}518)}{1 - 0{,}071} = 2{,}60 \text{ мкмоля АТФ на 1 г печени}$$

или

$$\frac{2{,}424 - (0{,}071 \cdot 0{,}518)}{1 - 0{,}071} = 2{,}58 \text{ мкмоля АТФ на 1 г печени.}$$

Содержание гексозомонофосфата:

$$\frac{0{,}879}{1-0{,}071}=0{,}93 \text{ мкмоля гексозомонофосфата на 1 г печени}$$

или

$$\frac{0{,}848}{1-0{,}072}=0{,}91 \text{ мкмоля гексозомонофосфата на 1 г печени.}$$

Источники ошибок. Разность экстинкции $\Delta E_{ГМФ}$ соответствует содержанию гексозомонофосфата в пробе. Только с высокоочищенным препаратом промежуточного фермента можно определить содержание глюкозо-6-фосфата. Имеющиеся в продаже препараты позволяют определять лишь содержание гексозомонофосфата. После окончания реакции АТФ в подобной кювете путем добавления креатинкиназы и АДФ можно определить содержание креатинфосфата.

Основным источником ошибок следует считать наличие в препаратах гексокиназы[1] и «промежуточного фермента» значительных примесей других ферментов.

В присутствии большого количества PO_4^{3-} в кюветах во время измерения часто наблюдается помутнение, вызванное образованием магний-аммоний фосфата.

Разбавленные ферментные растворы, стоявшие несколько дней, непригодны, они дают совершенно ошибочные результаты.

Систематических исследований специфичности гексокиназы (ГК) в отношении нуклеозид-трифосфата не имеется. Инозинтрифосфат (ИТФ) реагирует с гексокиназой из дрожжей, однако немного быстрее, чем АТФ. При ферментативном определении АТФ при помощи промежуточного фермента (гексокиназы) надо считаться с такими помехами. Точность метода 10—15%.

Другие методы определения АТФ

Флуорометрический ферментативный анализ[2] с люциферазой позволяет определять менее 1 *мкг* АТФ на 1 *мл* опытного раствора и строго специфичен.

При помощи препаратов картофельной апиразы[3], аденилаткиназы[4] и 5-АМФ-дезаминазы можно определить наряду с АТФ также АДФ и АМФ спектрофотометрическим измерением экстинкции при 265 *ммк*[5].

---

[1] КФ 2.7.1.1.

[2] B. Strehler a. W. McElroy. Methods in Enzymologie. N. Y., 1957, B. III, p. 871.

[3] КФ 3.6.1.5.

[4] КФ 3.5.4.2.

A. Munch-Petersen a. H. Kalckar. Там же, стр. 869.

Определение аденозин-5′-трифосфата [19]

П р и н ц и п. В присутствии люциферина, кислорода, магния и АТФ люцифераза катализирует образование аденил-люциферина из АТФ и люциферина. Аденил-люциферин реагирует с кислородом воздуха (в процессе люминесценции), образуя аденил-оксилюциферин. Эта реакция практически необратима и ее продукт — аденил-оксилюциферин — является мощным ингибитором люминесценции. Для определения АТФ измеряют относительную интенсивность свечения раствора люциферазы тотчас после смешивания его с исследуемым раствором АТФ (в присутствии достаточного количества ионов магния, кислорода и люциферина).

Р е а к т и в ы (для их приготовления используют дистиллированную воду, не содержащую ионы тяжелых металлов): 1) стандартный раствор АТФ: а) маточный раствор ($1{,}6 \cdot 10^{-4}$ *M* раствор): 2,5 *мг* АТФ-$Na_2H_2 \cdot 3H_2O$ растворяют в 250 *мл* дистиллированной воды. Раствор сохраняют замороженным при —20°; б) рабочий раствор ($1{,}6 \cdot 10^{-6}$ *M*): 5 *мл* раствора *а* разбавляют дистиллированной водой до 500 *мл*. Раствор сохраняют при 0—4° и ежедневно возобновляют; 2) люцифераза, раствор см. [1] Прочие растворы см. ниже, в разделе «Техника».

Стойкость разбавленных растворов АТФ при —20° колеблется. Поэтому стандартный раствор АТФ ежедневно заново возобновляют. Приготовленные препараты люциферазы при —20° устойчивы один год.

Т е х н и к а. *Подготовка исследуемого материала.* Ввиду задерживающего и денатурирующего действия трихлоруксусной кислоты для экстракции АТФ она непригодна. Во многих случаях, особенно когда исследуют высокодисперсные системы (культуры ткани, кровь, бактерии, водоросли и т. д.), достаточно нагревать пробы в течение 5—15 мин. при 100° (кипящая водяная баня). Но при этом все же необходимо пробу быстро довести до 100°, чтобы воспрепятствовать ферментативному распаду субстратов в пробе до инактивации фермента. Лучше всего смешивать пробу с дву- или трехкратным объемом кипящей воды. После нагревания пробу сейчас же помещают на ледяную баню или быстро замораживают и сохраняют так до анализа.

До использования этого метода для экстракции АТФ необходимо сравнить его с другими методами. Если исследуют зеленые водоросли, обычно достаточно нагревать пробу 10—15 мин., чтобы обеспечить полноту экстракции АТФ. Для более плотного материала однократная экстракция кипячением недостаточна. Ткани с высокой концентрацией фермента, реагирующего с АТФ, требуют особой обработки. Для анализа мышечной ткани пробы ее замораживают в смеси сухой лед/петролейный эфир, растирают в сухой ступке с замороженной 8%-ной хлорной кислотой (1 *мл* хлор-

---

[1] B. S t r e h l e r a. J. T o t t e r. Arch. Bioch. Bioph., 1952, **40**, 28.

ной кислоты на 100 *мг* мышц), смесь оттаивают и затем оставляют стоять на 10—15 мин. при 0°. Фильтруют, фильтрат нейтрализуют 1 н. раствором NaOH или KOH и дополняют дистиллированной водой до 25 *мл*. Раствор можно сохранять при —20°.

В некоторых случаях, например, при анализе хлоропластов, экстракция АТФ становится излишней. Обычно в пробах не проводят осаждения белка. Препарат люциферазы сам загрязнен значительным количеством миокиназы [1], фосфатазы [2] и апиразы [3]. Если исследуемый материал содержит светорассеивающие или абсорбирующие части (хлоропласты, митохондрии, взвешенные частички жира), то к главному опыту после определения содержащегося в нем количества АТФ прибавляют известное количество АТФ и анализ повторяют. Результаты главного опыта контролируют по данным анализа такого внутреннего стандарта.

Постановка опыта. В дальнейшем будут описаны четыре метода определения АТФ, в основе которых лежат два принципа: 1) содержащая АТФ проба быстро вводится в раствор люциферазы. Максимальная интенсивность света является мерой для концентрации АТФ. Однако необходимо учитывать, что максимальная интенсивность зависит как от присутствия АДФ, так и от быстроты, с которой смешивают пробу и фермент; 2) высокая концентрация арсената (или фосфата) и магния препятствуют быстрой убыли люминесценции. Мерой концентрации АТФ является интенсивность света, установленная путем экстраполяции к нулевому времени. И при этом способе проба и фермент должны быть быстро смешаны.

а) Если используют флуорометр, то 0,2 *мл* раствора люциферазы (препарат *а*) разбавляют дистиллированной водой до 0,6 *мл*. К этой смеси непосредственно перед измерением добавляют 0,2 *мл* пробы, быстро перемешивают и интенсивность света измеряют через 5, 10, 15, 20, 25 и 30 сек. после добавления пробы. б) Если применяют квантовый счетчик, то раствор люциферазы (препарат *б*) разбавляют 5-кратным количеством буферного раствора: 0,1 *М* арсенат/0,05 *М* Mg^{2+} (рН 7,4). К этому добавляют 1,5 часть объема пробы и дальше работают, как описано в (*а*); в) по этому способу 0,1 *мл* раствора люциферазы (препарат *в*) смешивают с 2,1 *мл* буферного серного раствора 0,025*М* глицилглицин 0,1*М* Mg^{2+}. Раствор помещают в измерительный прибор перед фотоэлектронным умножителем. Быстро впрыскивают в этот раствор (0,25 *мл* шприцем) 0,2 *мл* пробы и продолжают работать, как описано в (а); г) для непрерывного измерения концентрации АТФ в препаратах хлоропластов работают следующим образом: раствор люциферазы приготовляют по методу *а*. При этом фосфатный буферный раствор используют без $MgSO_4$. Смешивают следующие растворы: 0,2 *мл* раствора люциферазы, 1,4 *мл* суспензионной среды, 0,1 *мл* раствора ФМС (феназин-

[1] КФ 2.7.4.3.
[2] КФ 3.1.3.1.; КФ 3.1.3.2.
[3] КФ 3.6.1.5.

метасульфат), 0,1 *мл* раствора АМФ[1]. К этому добавляют при затемненном свете 0,2 *мл* суспензии хлоропласта (около 700 *мкг* хлоропласта на 1 *мл* суспензии). Смесь вливают в кювету (толщина слоя 2 *мм*).

Вычисление. Так как полученная посредством люциферазы люминесценция прямо пропорциональна концентрации АТФ, то найденную в главном опыте интенсивность света относят к интенсивности, измеренной в стандартном растворе. Линейность зависимости между интенсивностью люминесценции и концентрацией АТФ необходимо проверять.

Пример. Исследуют синтез АТФ в Chlorella pyrenoidosa. Главный опыт по методу «г» (стр. 270) содержит 2 *мг* (сырой вес) водоросли. Были измерены следующие значения:

Секунды после начала освещения	Люминесценция (импульс 15 сек.)	
0	1052	
10	1362	$\Delta_{20} = 1410$ имп/15 сек
20	2462	
30	2311	
60	2091	

$$\Delta_1 = \frac{\Delta_{20}}{\text{время освещения}} = \frac{1410}{20} = 70 \text{ импульсов за 15 сек.}$$

0,152 *мкг* $\sim P$[2] дают $\Delta_1 - 5000$ импульсов за 15 сек. Из этого следует, что в главном опыте были синтезированы $\frac{70 \cdot 0,152}{5000} \cdot 0,002$ *мкг* $\sim P$ за секунду освещения.

Главный опыт содержал 2 *мг* (2000 *мкг*) водорослей (свежий вес). Итак, водоросли синтезировали, считая на секунды освещения, 10^{-6} кратный вес АТФ ($\frac{0,002}{2000} = \frac{2.10^{-3}}{2 \cdot 10^{3}} = 10^{-6}$).

П р и л о ж е н и е. *Приготовление препарата люциферазы*. 50 *мг* высушенных в вакууме светящих органов светлячков растирают в течение 10 мин. с ледяным 0,1 *М* буферным раствором, в 1 *л* которого содержится 42,5 *г* арсената натрия (с 12 H_2O) и 10 *г* хлорида магния (с $6H_2O$). Смесь фильтруют, фильтрат собирают в пробирку на ледяной бане и растворяют в нем 50 *мг* сульфата магния ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$). Раствор годен несколько суток, если хранится при 4°.

И с т о ч н и к и о ш и б о к. Реакция специфична для АТФ, однако на люминесценцию оказывают влияние вещества, которые изменяют концентрацию аденозинтрифосфата, доступного действию люциферазы. Из возможных источников ошибок можно пере-

---

[1] Суспензионная среда: 0,139 *г* KH_2PO_4, 0,439 *г* NaCl и 0,341 *г* хлористого магния растворяют в воде и добавляют 95 *мл* трис-буфера (0,1 *М*, pH 8,0); раствор ФМС ($5 \cdot 10^{-4}$ *М*):0,145 *г* ФМС растворяют в 1000 *мл* воды; раствор АМФ ($2 \cdot 10^{-4}$ *М*):1,03 *г* АМФ растворяют в воде и доливают водой до 500 *мл*.

[2] 1 *мкг* $\sim P$ соответствует 8,15 *мкг* АТФ.

числить: 1) обеднение кислородом вследствие повышенной активности дыхания в пробе или в препарате люциферазы; 2) подавление флуоресценции некоторыми анионами, мутью, абсорбцией или природными препятствующими веществами; 3) использование АТФ в побочных реакциях или связывание АТФ в неактивных центрах (высокие концентрации буферного раствора арсената действуют против этой помехи); 4) люминесцирующие или фосфоресцирующие примеси; 5) наличие ионов аммония в растворах; 6) примесь гидролизующих ферментов в исследуемом материале (эту помеху можно устранить, если белок удаляют хлорной кислотой); 7) введение пробы в опыт при недостаточно затемненном свете. Почти все эти помехи исключаются путем использования внутренних стандартов. Точность метода (при соблюдении всех условий) 1,5%. Детали см. [19].

Определение аденозин-монофосфорной кислоты [20][1]

П р и н ц и п. Экстракт печени собаки служит источником относительно мало активной дефосфорилазы и соответствующей киназы, но весьма активной фосфорилазы [2] и фосфатазы [3]. Реакция, протекающая при участии вышеназванных компонентов печеночного экстракта, выражается следующей схемой:

$$\underset{\text{(неактивная)}}{\text{дефосфорилаза печени}} \underset{\text{фосфатаза}}{\overset{\text{АТФ, ионы магния, киназа}}{\rightleftarrows}} \underset{\text{(активная)}}{\text{фосфорилаза печени}}$$

Добавление АМФ заметно повышает фосфорилазную активность. Последняя может быть измерена посредством определения скорости образования гликогена из глюкозо-1-фосфата. Количественное определение глюкозо-1-фосфата можно провести, использовав сопряженную с фосфорилированием гликогена реакцию восстановления никотинамидадениндинуклеотидфосфата фосфоглюкомутазой, а глюкозо-6-фосфорной кислоты — дегидрогеназой. Таким путем определяют количества АМФ порядка 10^{-6} *М*.

В предлагаемом методе во избежание ферментативного восстановления добавленного никотинамидадениндинуклеотидфосфата другими субстратами, присутствующими в экстракте печени, последние предварительно удаляют диализом. С целью активирования фосфорилазы экстракт печени инкубируют с АМФ.

Р е а к т и в ы: 1) калий-фосфатный буферный раствор, 0,002 *М*, pH 7,4; 2) жидкость для инкубации: в калий-фосфатном буфере, 0,125 *М*, pH 7,4, растворяют следующие вещества до конечной

[1] Относительно деталей анализа см. [20]. Менее точный, но практически легко выполнимый метод основан на расщеплении АМФ щелочной фосфатазой с последующим дезаминированием образующегося аденозина в инозин, что позволяет закончить анализ спектрофотометрическим измерением (см. H. K a l c k a r, J. Biol. Chem, 1947, 167, 445).

[2] КФ 2.4.1.1.— фосфорилаза мышц.

[3] КФ 3.1.3.1; 3. 1.3.2.

концентрации: фтористый натрий — 0,02 *М*, АМФ — 0,001 *М*, АТФ — 0,003 *М*, кофеин — 0,60067 *М*, хлористый магний — 0,6005 *М* и гликоген — 2%; 3) фермент-субстратная смесь для определения активности фосфорилазы: 0,05 *М* трис-соляная кислота до pH 7,4 — 1 *мл*, 0,01 *М* раствор хлористого магния — 1 *мл*, 0,005 *мл* раствора фосфоглюкомутазы (активность — 250 *ед/мл*), 0,005 *мл* раствора дегидрогеназы глюкозо-6-фосфорной кислоты (250 *ед/мл*); 4) никотинамидадениндинуклеотидфосфат.

Техника. Печень гомогенизируют [1] и в опыт берут надосадочную жидкость, полученную путем центрифугирования гомогената при 11 000 *g*. Экстракт инкубируют при 37° в течение 20 мин. и затем быстро замораживают, поместив пробирку в смесь сухого льда с этанолом. Экстракт держат в сухом льду до тех пор, пока он полностью не потеряет способности взаимодействовать с АМФ. Затем экстракт диализируют дважды против 50 объемов 0,002 *М* калий-фосфатного буфера pH 7,4 в течение 3 час. при температуре 2°. Материал, исследуемый на содержание АМФ, инкубируют в течение 40 мин. (30°) с 1 *мл* инкубационной жидкости, содержащим 0,4 *мл* экстракта печени собаки. По прошествии этого времени инкубационную смесь помещают в кипящую водяную баню на 3 мин. и затем центрифугируют. Аликвотную пробу (0,025 *мл*) надосадочной жидкости переносят в кювету спектрофотометра (толщина слоя 1 *см*), добавляют фермент-субстратную смесь (0,025 *мл*) и затем, поместив кювету в спектрофотометр, НАДФ в количестве 300 *мкмолей*. Определяют экстинкцию раствора при 340 *ммк*.

Вычисление. При расчете количества АМФ пользуются калибровочной кривой, на которой количество НАДФ-H_2 отложено против концентрации АМФ в пределах от 0,1 до 1,5 $M \cdot 10^{-7}$.

Источники ошибок. Стимулирующее действие на вышеописанную ферментную систему оказывают различные аналоги АМФ в следующих концентрациях: дезокси-АМФ — 10^{-4} *М*, инозин-монофосфат — 10^{-6} *М*, цитидин-монофосфат — 10^{-4} *М*, уридин-монофосфат — 10^{-5} *М*; дезоксицитидин-монофосфат и тимидин-монофосфат не дают эффекта в концентрации 10^{-2} *М*.

Определение аденозин-5-дифосфата и аденозин-5-монофосфата [22]

Принцип. Аденозин-5-дифосфат (АДФ) фосфорилируют фосфоэнолпируватом и пируваткиназой (ПК); образовавшийся пируват разлагают действием НАД-H_2 и лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Аденозин-5-монофосфат (АМФ) фосфорилируют действием АТФ и миокиназы (МК) и определяют возникшую при этом АДФ (два эквивалента). Таким образом, в ходе работы можно определить пируват, АДФ и затем АМФ.

$$\text{АМФ} + \text{АТФ} \underset{}{\overset{\text{МК, } Mg^{2+}}{\rightleftarrows}} 2\text{АДФ}, \quad (1)$$

$$2\text{АДФ} + 2\text{ фосфоенолпируват} \overset{\text{ПК, } Mg^{+2}, K^{+}}{\rightleftarrows} 2\text{АТФ} + 2\text{ пируват}. \quad (2)$$

Индикаторная реакция:

$$2\ \text{пирувата} + 2\text{НАД-Н} + 2H^+ \underset{}{\overset{\text{ЛДГ}}{\rightleftarrows}} 2\ \text{лактата} + 2\text{НАД}^+. \qquad (3)$$

Равновесие реакции (3) лежит при $K \simeq 10^{4}$ 1/*моль* достаточно далеко на правой стороне, что позволяет определить все количество пирувата. Равновесие реакции (2) при $K = 2 \cdot 10^3$ при 30° лежит так далеко на правой стороне, что можно определить все количество АМФ.

Реактивы: 1) триэтаноламиновый буферный раствор ($5 \cdot 10^{-2}$ *М*, pH 7,55) : 7,46 *г* триэтаноламина растворяют примерно в 700 *мл* бидистиллированной воды, доводят при помощи 15 *мл* 2 н. раствора HCl pH до 7,55, доливают бидистиллированной водой до 1000 *мл*; 2) сульфат магния (0,5 *М* раствор): 6,02 *г* $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ растворяют в бидистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*; 3) хлорид калия (2 *М* раствор): 14,91 *г* KCl растворяют в бидистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*; 4) раствор ЭДТА (тетраацетатэтилендиамина), (100 *мг/мл*): 10 *г* реактива растворяют в бидистиллированной воде, нейтрализуют 2 н. раствором NaOH, дополняют бидистиллированной водой до 100 *мл*; 5) фосфоенолпируват (около $4 \cdot 10^{-2}$ *М* раствор ФЕП): 100 *мг* ФЕП в виде кристаллической соли трициклогексиламмония растворяют в бидистиллированной воде и дополняют до 5 *мл*. Содержание ФЕП в растворе определяют ферментативно; 6) восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (около 10^{-2} *М* раствор НАД-H_2): 20 *мг* НАД-Н-Na_2 растворяют в 2 *мл* бидистиллированной воды. Содержание НАД-H_2 в растворе определяют ферментативно; 7) аденозинтрифосфат (около 10^{-2} *М* раствор АТФ): 10 *мг* АТФ-$Na_2H_2 \cdot 3H_2O$ растворяют в 2 *мл* бидистиллированной воды; 8) аденозинмонофосфат (около 10^{-2} *М* раствор АМФ): 10 *мг* АМФ-Na_2 растворяют в 2 *мл* бидистиллированной воды; 9) лактатдегидрогеназа, ЛДГ (0,1 *мг* белка на 1 *мл*): 0,01 *мл* кристаллической суспензии (10 *мг* белка на 1 *мл*) разбавляют 2,25 *М* раствором сульфата аммония (pH 6,5) до 1 *мл*; 10) пируваткиназа, ПК (0,5 *мг* белка на 1 *мл*): 0,1 *мл* кристаллической суспензии (5 *мг* белка на 1 *мл*) разбавляют 2,1 *М* раствором сульфата аммония (pH 5,5) до 1 *мл*; 11) миокиназа, МК (0,25 *мг* белка на 1 *мл*): 0,05 *мл* кристаллической суспензии (5 *мг* белка на 1 *мл*) разбавляют 3,3 *М* раствором сульфата аммония (pH 6) до 1 *мл*.

Для осаждения белков применяют 2 н. раствор KOH; 3,75 *М* раствор K_2CO_3; растворы хлорной кислоты: а) 0,9 н.: 7,7 *мл* хлорной кислоты разбавляют бидистиллированной водой до 100 *мл*; б) 0,2 н.: 1,7 *мл* хлорной кислоты разбавляют бидистиллированной водой до 100 *мл*.

Реактивы 8 и 9 необходимо ежедневно готовить заново. Замороженный водный раствор НАД-H_2 (6) можно хранить две недели (после оттаивания — только сутки). Все остальные реактивы при хранении в холодильнике устойчивы в течение ряда месяцев.

Т е х н и к а. Для получения экстракта используется методика, разработанная для экстракции АДФ и АМФ из тканей при определении аденозин-5-трифосфата посредством фосфоглицераткиназы [1].

Постановка опыта. Измерение ведут при 340 или 366 *ммк*; толщина слоя 10 *мм*, объем анализируемой жидкости 2,0 *мл*; комнатная температура.

Готовят следующую реакционную смесь и нейтрализуют: 0,036 *мл* раствора сульфата магния (2), 0,076 *мл* раствора хлорида калия (3), 0,6004 *мл* раствора ЭДТА (4), 0,040 *мл* раствора ФЭП (5), 0,030 *мл* раствора НАД-H_2 (6), 0,007 *мл* раствора АТФ (7) или кратное отдельных объемов.

В кюветы последовательно вносят пипеткой: безбелковую пробу (экстракт) 1 *мл* и буферный раствор (1) до 2,00 *мл*; 0,140 *мл* реакционной смеси. Уплощенной внизу стеклянной или пластмассовой палочкой добавляют 0,020 *мл* суспензии ЛДГ (9); наблюдают экстинкцию, пока она не станет постоянной (через 3—5 мин.). Отмечают начальную экстинкцию E_1. Добавляют 0,020 *мл* суспензии ПК (10). Через 6—9 мин. измеряют убыль экстинкции вплоть до окончания реакции (E_2). Прибавляют 0,018 *мл* суспензии МК (11). В течение 10—13 мин. измеряют убыль экстинкции вплоть до окончания реакции (E_3). Если реакция не закончена, экстраполируют, как указано выше. Для контроля функциональной способности системы в кювету добавляют около 0,01 *мл* раствора АМФ (8). Реакция должна тотчас же возобновиться. Разности экстинкции: $E_1 - E_2 = \Delta E_{АДФ}$ и $E_2 - E_3 = \Delta E_{АМФ}$ входят в вычисление.

Вычисление. Коэффициенты экстинкции для НАД-H_2 при 25°:

$$\varepsilon_{340} = 6,22 \ (см^2/мкмоль);$$

$$\varepsilon_{366} = 3,30 \ (см^2/мкмоль);$$

$$\frac{\Delta E_{АДФ}\cdot V_А\cdot V_Е}{\varepsilon\cdot d\cdot V_Р} = \textit{мкмолей}\ \text{АДФ в общем объеме экстракта}\ (\textit{мл})$$

и

$$\frac{E_{АМФ}\cdot V_А\cdot V_Е}{2\cdot\varepsilon\cdot d\cdot V_Р} = \textit{мкмолей}\ \text{АМФ в общем объеме экстракта}\ (\textit{мл}).$$

$$\Delta E_{АДФ} = E_1 - E_2; \quad \Delta E_{АМФ} = E_2 - E_3, \text{ где}$$

$V_А$ — объем опытного раствора в кювете (2,0 *мл*);
$V_Е$ — объем общего экстракта (*мл*);
$V_Р$ — объем содержащейся в кювете части общего экстракта (*мл*);
ε — коэффициент экстинкции (*см²/мкмоль*);
d — толщина слоя в кювете (1 *см*).

Для измерения при 366 *ммк* при указанных условиях

$$\frac{E_{АДФ}\cdot 2\cdot V_Е}{3,30\cdot 1\cdot V_Р} = E_{АДФ}\cdot 0,606\cdot\frac{V_Е}{V_Р} = \textit{мкмолям}\ \text{АДФ в общем экстракте}$$

[1] См. определение АТФ, стр. 262.

$$\Delta E_{\text{АМФ}} \cdot 0{,}303 \cdot \frac{V_{\text{Г}}}{V_{\text{Р}}} = \textit{мкмолям}\ \text{АМФ в общем экстракте.}$$

Если эти значения делят на взятый вес свежей ткани, то получают *мкмоли* АДФ или *мкмоли* АМФ на 1 *г* ткани.

В пределах общепринятых средних ошибок $\pm$ 1,5% результаты воспроизводимы и согласуются с УФ-абсорбционными фосфат- и рибозо-измерениями. Количество менее 10^{-8} *М* нуклеотидов может быть измерено с этой точностью. Микрокюветы облегчают определение 10^{-9} молей нуклеотидов.

Источники ошибок. ИДФ, ГДФ, УДФ или ЦДФ реагируют количественно, но в различной степени. Помимо ИДФ, также ГДФ или УДФ могут в ходе реакции отличаться от АДФ; только для ЦДФ возможно внесение поправки путем экстраполяции.

Определение аденозинфосфата [23]

Принцип. Щелочные фосфатазы расщепляют аденозинфосфаты на аденозин и неорганический фосфат. Аденозиндезаминаза дезаминирует аденозин в инозин, причем экстинкция при 265 *ммк* уменьшается соответственно использованному количеству аденозина, что позволяет закончить анализ фотометрическим измерением.

Реактивы: 1) триэтаноламиновый буфер (0,05 *М* раствор, pH 8,4): 930 *мг* гидрохлорида триэтаноламина растворяют в бидистиллированной воде, доводят объем до 60 *мл* и добавляют 40 *мл* 0,1 н. раствора едкого натра; 2) аденозиндезаминаза (100 *мг* белка на 1 *мл*): суспензию фермента соответственно разбавляют 2,5 *М* раствором сульфата аммония; 3) фосфатаза (5 *мг* белка на 1 *мл*): 5 *мг* сухого порошка растворяют в триэтаноловом буферном растворе (1) до 1 *мл*. Мутные растворы центрифугируют (иногда для просветления их необходима скоростная центрифуга.

Все растворы сохраняют при 0—4°. Буферный раствор и суспензия дезаминазы сохраняются в таких условиях несколько месяцев. Раствор фосфатазы приблизительно через неделю возобновляют заново. Сухой порошок фосфатазы в сухом помещении сохраняется при 0—4° в течение нескольких месяцев.

Техника. *Подготовка исследуемого материала.* Содержащие белок пробы очищают от белка (чтобы избежать мешающего влияния экстинкции, обусловливаемой белком). Нет необходимости очищать от белка смеси из гидролизата нуклеотидов, нуклеиновой кислоты и других подобных исследуемых материалов.

Постановка опыта. В большинстве случаев проба содержит и другие нуклеотиды и нуклеозиды, высокая экстинкция которых при 265 *ммк* затрудняет точное определение АМФ и аденозина. Поэтому наряду с главным анализом ставят и пустой опыт. Измерение ведут при 265 *ммк* в кварцевых кюветах, толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 3 *мл*, температура комнатная. Измерение производят против буферного раствора (1) или буферного раствора + проба.

В кюветы последовательно вливают пипеткой: 2,46 —2,94 *мл* буферного раствора (1), 0,50—0,02 *мл* пробы. Перемешивают и измеряют начальную экстинкцию E_1 (она не должна превышать 0,500). Добавляют 0,02 *мл* суспензии дезаминазы (2); экстинкцией, обусловленной ферментным белком, пренебрегают. На протяжении 1 мин. отсчитывают экстинкцию. Приблизительно через 5 мин. измеряют конечное значение экстинкции E_2. Затем добавляют 0,02 *мл* раствора фосфатазы (3) и в течение 1 мин. отсчитывают экстинкцию до конечного значения E_3 (5—15 мин.). Вновь добавляют 0,02 *мл* раствора фосфатазы (3) и отсчитывают экстинкцию E_4.

$E_4 - E_5 = \Delta E_{ph}$ представляет экстинкцию фосфатазы; ее значение вычитают из E_3 и получают $E_{3испр} \cdot E_2 - E_{3испр} = \Delta E_{АМФ}$ и $E_1 - E_2 = \Delta E_{аденозин}$ входит в вычисление. $E_{АМФ}$ представляет содержание в пробе всех аденозинфосфатов, не содержащих пирофосфаты.

Вычисление. 1 *мкг* аденозина (1 267 *ммоль*) вызывает при 265 *ммк* в 3 *мл* измеряемого объема изменение экстинкции, равное $\Delta E = 0{,}0101$. Таким образом:

$$\frac{\Delta E_{аденозин}}{0{,}0101 \cdot (мл\ пробы\ в\ опыте)} = мкг\ аденозина/мл\ пробы;$$

$$\frac{\Delta E_{аденозин}}{2{,}70 \cdot (мл\ пробы\ в\ опыте)} = мкмолям\ аденозина/мл\ пробы;$$

$$\frac{\Delta E_{АМФ}}{2{,}70 \cdot (мл\ пробы\ в\ опыте)} = мкмолям\ аденозинфосфата/мл\ пробы;$$

$$\frac{\Delta E_{АМФ}}{0{,}00777 \cdot (мл\ пробы\ в\ опыте)} = мкг\ аденозинфосфата/мл\ пробы$$

Если выбрана область фотометрической шкалы, на которой $\Delta E = 0{,}010$ отсчитывается достаточно точно, то возможно еще определить около 2 *мкг* (около $2 \cdot 10^{-2}$ *мкмолей*) аденозина или аденозинфосфата на 1 *мл* пробы.

Пример. Ферментный анализ используют для контроля расщепления 3′ (2′)-нуклеотидов на нуклеозиды. 1 *мл* пробы смеси разбавляют водой 1 : 10; 0,05 *мл* берут в опыт. В предварительном опыте после прибавления обоих ферментов было найдено: $E_1 \approx 1{,}2$, $E_3 \approx 0{,}8$. В главном опыте к результату пустого опыта было прибавлено:

$$\frac{3}{4} \cdot 0{,}8 \cdot \frac{0{,}05}{1{,}2} = 0{,}025 \approx 0{,}03\ мл\ пробы.$$

Измерения против этого пустого значения дали:

$$E_1 = 0{,}495;\ E_2 = 0{,}283;\ E_3 = 0{,}031;\ E_4 = 0{,}074;$$

$$E_1 - E_2 = \Delta E_{аденозин} = 0{,}212;\ E_4 - E_3 = \Delta E_{ph} = 0{,}043;$$

$$E_3 - \Delta E_{ph} = E_{3испр} = -0{,}012;\ E_2 - E_{3испр} = \Delta E_{АМФ} = = 0{,}283 - (-0{,}012) = 0{,}295.$$

Из этого следует содержание аденозина:

$$\frac{0{,}212 \cdot 10}{2{,}70 \cdot 0{,}05} = 15{,}7 \text{ мкмоля в 1 мл пробы.}$$

Содержание АМФ:

$$\frac{0{,}295 \cdot 10}{2{,}70 \cdot 0{,}05} = 21{,}8 \text{ мкмоля в 1 мл пробы.}$$

А-5′-МФ в опыте с миокиназой не был обнаружен.

Источники ошибок. В некоторых случаях фильтраты тканей содержат ингибиторы аденозин-дезаминазы. Обычно в этом случае может помочь добавление большего количества фермента или же пробу очищают пропусканием через иониты (Амберлит IR4B); необходимо также устранять даже следы мути, которая завышает величину экстинкции при 265 *ммк*.

Определение уридиндифосфоглюкозы, уридиндифосфогалактозы, уридинтрифосфата, уридиндифосфоглюкуроновой кислоты [24]

Определение уридиндифосфоглюкозы

А. Определение посредством уридилтрансферазы[1], *фосфоглюкомутазы*[2] *и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы*[3]

Принцип. Посредством пирофосфоролитического расщепления уридиндифосфоглюкозы (УДФГ) образуется УТФ и Г-1-Ф — уравнение (1); Г-1-Ф переходит в Г-6-Ф — уравнение (2). Последний при помощи НАДФ окисляется в 6-ФГ — уравнение (3).

$$\text{УДФГ} + \text{пирофосфат} \rightleftarrows \text{УТФ} + \text{Г-1-Ф}; \qquad (1)$$

$$\text{Г-1-Ф} \rightleftarrows \text{Г-6-Ф}; \qquad (2)$$

$$\text{Г-6-Ф} + \text{НАДФ}^+ \rightarrow \text{6-ФГ} + \text{НАДФ-Н} + \text{Н}^+. \qquad (3)$$

$$\text{УДФГ} + \text{пирофосфат} + \text{НАДФ}^+ \rightarrow \text{УТФ} + \text{6-ФГ} + \text{НАДФ-Н} + \text{Н}^+.$$

Реакции катализируются: (1) — уридилтрансферазой, (3) — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой[3]. В присутствии избыточного фосфата УДФГ количественно переходит в УТФ. Измеряя увеличение экстинкции НАДФ-Н при 340 *ммк*, можно закончить анализ спектрофотометрически.

Реактивы: 1) трис-буферный раствор (0,1 *М*; pH 7,8): 6,06 *г* трис-гидроксиметиламинометана растворяют в 200 *мл* дистиллированной воды, прибавляют 35 *мл* 1 н. раствора HCl и доливают дистиллированной водой до 500 *мл*; 2) хлорид магния (около 0,5 *М* раствор): 20,3 *г* $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ растворяют в дистиллированной

---

[1] КФ 2.7.7.12.
[2] КФ 2.7.5.1.
[3] КФ 1.1.1.49.

воде и объем доводят до 200 *мл*; 3) цистеин (около 0,2 *М* раствор): 40 *мг* цистеин-гидрохлорида растворяют в 1 *мл* дистиллированной воды, pH доводят до 7,0 1 н. раствором KOH (индикаторная бумага). Раствор готовят заново ежедневно; 4) пирофосфат калия (0,1 *М* раствор): 3,84 *г* $K_4P_2O_7$ $3H_2O$ растворяют в дистиллированной воде и объем доводят до 100 *мл*; 5) никотинамидадениндинуклеотидфосфат (около 10^{-2} *М* раствор НАДФ): 8,7 *мг* НАДФ-NaH_2 растворяют в 1 *мл* дистиллированной воды; 6) уридилтрансфераза[1]; осажденный сульфатом аммония препарат растворяют в таком количестве трис-буферного раствора (1), чтобы 10 *мкл* ферментного раствора в описанной ниже исходной смеси при помощи 0,1 *мкмоля* чистой УДФГ давали начальную скорость изменения экстинкции E в 1 мин. = 0,100; 7) фосфоглюкомутаза[2], ФГлюМ (3 *мг* белка на 1 *мл*): продажный препарат разбавляют 2,5 *М* раствором сульфата аммония; 8) глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа[3], Г6Ф-ДГ (10 *мг* белка на 1 *мл*): продажный препарат соответственно разбавляют 3,3 *М* раствором сульфата аммония. Растворы цистеина и уридилтрансферазы ежедневно готовят свежие; раствор фосфата устойчив при хранении в течение месяца при 4°, раствор НАДФ при температуре от —10 до —15° — в течение 2 месяцев, раствор фосфоглюкомутазы от —10 до —15° в течение 1 месяца, в виде кристаллической суспензии в растворе сульфата аммония — дольше года.

Раствор глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (см. стр. 658) устойчив при —15° в течение 1 недели, в виде кристаллической суспензии в растворе сульфата аммония — в течение 1 года.

Техника. *Подготовка исследуемого материала.* Анализируемые пробы должны сохраняться в водных растворах (pH 7—8). Ткани размельчают в ледяном растворе хлорной кислоты (конечная концентрация 2% в/об), центрифугируют. Надосадочную жидкость нейтрализуют посредством 3 н. раствора KOH до pH 7; оставляют стоять в течение 1 часа при 0°, выделившуюся $KClO_4$ отцентрифуговывают, надосадочную жидкость используют для анализа.

Постановка опыта. Измерение ведут при 340 *ммк* в кварцевых кюветах, толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 1,0 *мл*. Измерение ведут против кюветы сравнения. В кювету опыта и контрольную кювету вносят пипеткой: 0,10 *мл* пробы, 0,80 *мл* трис-буферного раствора (1), 0,01 *мл* раствора $MgCl_2$ (2), 0,01 *мл* раствора цистеина (3), 0,025 *мл* раствора НАДФ (5), 0,025 *мл* раствора фосфоглюкомутазы (см. стр. 659) (7), 0,01 *мл* раствора Г6Ф-ДГ(8), 0,01 *мл* раствора уридилтрансферазы (6). Отсчитывают экстинкцию E_1. В контрольную пробу добавляют 0,01 *мл* раствора $K_4P_2O_7$ (4) и каждую минуту отсчитывают экстинкции, конечное значение E_2. Разность экстинкции $\Delta E = E_2 - E_1$ входит в вычисление.

---

[1] Получение см. A. Munch-Petersen. Acta Chem. Scand., 1955, **9**, 1523 (КФ 2.7.7.12).

[2] Получение см. V. Najjar. J. Biol. Chem., 1948, **175**, 281 (КФ 2.7.5.1).

[3] Получение см. A. Kornberg, J. Biol. Chem., 1950, **182**, 805 (КФ 1.1.1.9).

Вычисление:

$$\frac{\Delta E}{6{,}22} = \text{мкмолей УДФГ/смесь},$$

где $\Delta E = E_2 - E_1$; 6,22—коэффициент экстинкции НАДФ-H_2 *см²/мкмоль* при 340 *ммк*.

Источники ошибок. Опыт специфичен для УДФГ. Присутствие глюкозо-1-фосфата и глюкозо-6-фосфата в пробе ведет к избыточному образованию НАДФ-H_2, но это не мешает определению, так как такое же по величине увеличение экстинкции наступает и в контрольной кювете. Наличие неорганического пирофосфата в пробе мешает анализу.

Б. Определение посредством УДФГ-дегидрогеназы

Принцип. УДФГ-дегидрогеназа катализирует реакцию превращения уридиндифосфоглюкозы (УДФГ) в уридиндифосфоглюкуроновую кислоту (УДФГК):

$$\text{УДФГ} + 2\text{НАД}^+ \rightarrow \text{УДФГК} + 2\text{НАД-H} + 2\text{H}^+. \quad (4)$$

Реакция необратима, оптимум pH 8,7. Измеряют увеличение экстинкции НАД-H_2 при 340 *ммк*.

Реактивы: 1) трис-буферный раствор (0,1 *М*, pH 8,7): 6,06 *г* трис-гидроксиметиламинометана растворяют в 200 *мл* дистиллированной воды, pH доводят до 8,7 10 *мл* 1 н. раствора HCl и доливают дистиллированной водой до 500 *мл*; 2) никотинамидадениндинуклеотид ($2{,}5 \cdot 10^{-4}$ *М* раствор НАД) : 19,3 *мг* НАД растворяют в 1 *мл* дистиллированной воды; 3) УДФГ-дегидрогеназа (25 000 *ед/мл*): продажный препарат разбавляют дистиллированной водой.

Приготовленный ферментный раствор устойчив при —10° около 6 недель. Раствор НАД при температуре от —10 до —15° устойчив в течение 2 месяцев.

Техника. *Постановка опыта.* Измерение ведут при 340 *ммк* в кварцевой кювете: толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 1 *мл*. Измерение ведут против сравнительной кюветы.

В кювету с главным опытом и в кювету для сравнения вливают пипеткой: 0,10 *мл* пробы, 0,87 *мл* буферного раствора (1) и 0,01 *мл* раствора фермента (3). Отсчитывают экстинкцию E_1, затем только в кювету с главным опытом вносят 0,02 *мл* раствора НАД (2) и каждую минуту отсчитывают экстинкцию. Постоянное конечное значение — E_2. Разность экстинкции $\Delta E = E_2 - E_1$ входит в вычисление.

Вычисление. На 1 *мкмоль* УДФГ образуется 2 *мкмоля* НАД-H_2. Отсюда следует:

$$\frac{\Delta E}{6{,}22 \cdot 2} = \frac{\Delta E}{12{,}44} = \text{мкмолям УДФГ/смесь},$$

где $\Delta E = E_2 - E_1$, 6,22 — коэффициент экстинкции НАД-H_2 (*см²/мкмоль*) при 340 *ммк*.

Источники ошибок. Метод специфичен для УДФГ, УДФГал (уридиндифосфоацетилглюкозамин, гуанозиндифосфоманноза, глюкозо-1-фосфат и глюкозо-6-фосфат не реагируют). Наличие примеси НАД в пробе мешает анализу; ее удаляют пропусканием пробы через дауекс-50(H^+-форма). Точность метода 2%.

Определение уридиндифосфогалактозы

Принцип. УДФГал-4-эпимераза переводит уридиндифосфогалактозу (УДФГал) в уридиндифосфоглюкозу (УДФГ). УДФГ определяют по одному из вышеописанных методов.

УДФГал-4-эпимераза имеет оптимум активности при pH 8,0 и 9,6. Должны присутствовать каталитические количества НАД ($5 \cdot 10^{-5}$ *М*). Если УДФГ используют по методу А, то рекомендуется pH 8,0. Для метода Б рекомендуется pH 8,7.

Реактивы. Кроме приведенных выше (см. стр. 278) для метода А необходимы: 1) трис-буферный раствор (0,1 *М*, pH 8,0): 6,06 *г* трис-гидроксиметиламинометана растворяют в 200 *мл* дистиллированной воды, добавляют 28 *мл* 1н. раствора HCl, доливают дистиллированной водой до 500 *мл*; 2) никотинамидадениндинуклеотид ($2,5 \cdot 10^{-4}$ *М* раствор НАД): 19,3 *мг* НАД растворяют в 1 *мл* дистиллированной воды. Для метода А и Б: 3) УДФГал-4-эпимераза (2,5 *мг* белка на 1 *мл*): 2,5 *мг* фермента растворяют в 1 *мл* дистиллированной воды. Раствор ежедневно готовят заново.

Метод А

Техника. Берут 2 кюветы с главным опытом (К1 и К2) и одну кювету для сравнения. Кюветы загружают, как описано выше (см. стр. 279), однако вместо трис-буферного раствора pH 7,8 применяют трис-буферный раствор с pH 8,0. После прибавления уридилтрансферазы[1] и перед отсчетом экстинкции E_1 в обе кюветы с опытом вносят по 0,01 *мл* раствора НАД и только в кювету с опытом К2 — 0,01 *мл* раствора УДФГал-4-эпимеразы. Отсчитывают экстинкцию при 340 *ммк*, как описано выше. $\Delta E_{К2}$ является мерой для содержания УДФГ и УДФГал в исходной смеси. $\Delta E_{К1}$ повторяет содержание УДФГ.

Вычисление

$$\frac{\Delta E_{К2} - \Delta E_{К1}}{6,22} = \text{мкмолям УДФГал/опытная смесь},$$

где $E_{К1} = E_2' - E_1$ для кюветы с опытом К1 (без УДФГал-4-эпимеразы), $E_{К2} = E_2 - E_1$ для кюветы с опытом К2 (с УДФГал-4-эпимеразой), 6,22 — коэффициент экстинкции НАД-H_2 (*см²/мкмоль*) при 340 *ммк*.

---

[1] КФ 2.7.7.12.

Метод Б

Т е х н и к а. Заполняют две кюветы с опытом (К1 и К2) и одну кювету для сравнения. В кювету с опытом К2 после прибавления УДФГ-дегидрогеназы и перед отсчетом экстинкции E_1 вносят 0,01 *мл* раствора УДФГал-4-эпимеразы. Отсчитывают экстинкции. E_{K2} является мерой для содержания УДФГ и УДФГал в исходной смеси; E_{K1} повторяет содержание УДФГ.

Вычисление. На 1 *мкмоль* УДФГ и УДФГал соответственно образуются 2 *мкмоля* НАД-H_2. Из этого следует:

$$\frac{\Delta E_{K2} - E_{K1}}{6{,}22\cdot 2} = \frac{\Delta E_{K2} - \Delta E_{K1}}{12{,}44}$$ *мкмолей* УДФГ на главный опыт,

где $\Delta E_{K1} = E_2 - E_1$ для кюветы с опытом К1 (без УДФГал-4-эпимеразы); $\Delta E_{K2} = E_2 - E_1$ для кюветы с опытом К2 (с УДФГал-4-эпимеразой); 6,22 — коэффициент экстинкции для НАД-H_2 (*см²/мкмоль*) при 340 *ммк*. Точность метода 2%.

Определение уридинтрифосфата

А. Определение посредством нуклеозиддифосфокиназы[1]

П р и н ц и п. Нуклеозиддифосфокиназа катализирует реакцию

$$\text{УТФ} + \text{АДФ} \rightarrow \text{УДФ} + \text{АТФ}. \qquad (1)$$

Образующийся аденозинтрифосфат (АТФ) определяют посредством гексокиназы (ГК) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ):

$$\text{АТФ} + \text{глюкоза} \xrightarrow{\text{ГК}} \text{глюкозо-6-фосфат} + \text{АДФ} \qquad (2)$$

$$\text{Глюкозо-6-фосфат} + \text{НАДФ}^+ \xrightarrow{\text{Г6Ф-ДГ}} \text{6-фосфоглюконовая кислота} + \text{НАДФ-Н} + \text{Н}^+ \qquad (3)$$

$$\text{УТФ} + \text{глюкоза} + \text{НАДФ}^+ \rightarrow \text{УДФ} + \text{6-ФГ} + \text{НАДФ-Н} + \text{Н}^+$$

На 1 *мкмоль* УТФ образуется, таким образом, 1 *мкмоль* НАДФ-H_2. Измеряют увеличение экстинкции НАДФ-H_2 при 340 *ммк*. К исходной смеси прибавляют АДФ лишь в небольшом количестве, так как он регенерируется в реакцию (2). Нуклеозиддифосфорилаза активируется Mg^{2+} ($5\cdot 10^{-3}$ *М*). Ее оптимум активности между pH 6 и pH 8 (получение см. B e r g P. a. J o k l i k W. J. Biol. Chem., 1957, **210**, 657).

Р е а к т и в ы: 1) трис-буферный раствор (0,1 *М*, pH 7,8): см. выше (стр. 278); 2) хлорид магния (0,5 *М* раствор): см. стр. 278; 3) глюкоза (10%-ный раствор в/о): 1 *г* глюкозы растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 10 *мл*; 4) аденозиндифосфат ($5\cdot 10^{-3}$ *М* раствор АДФ): 2,5 *мг* АДФ-Na_3 растворяют в 1 *мл* дис-

[1] КФ 27.1.1.

тиллированной воды; 5) никотинамидадениндинуклеотидфосфат (10^{-2} *М* раствор НАДФ); 6) нуклеозиддифосфокиназа (2 *мг* белка на 1 *мл*): препарат фермента соответственно разбавляют дистиллированной водой; 7) гексокиназа (см. стр. 659), ГК (10 *мг* белка на 1 *мл*): сухой препарат или кристаллическую суспензию соответственно разбавляют дистиллированной водой; 8) глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (см. стр. 658), Г6Ф-ДГ (10 *мг* белка на 1 *мл*).

Раствор АДФ стоек при —15° в течение 10 недель. Раствор нуклеозиддифосфокиназы при хранении при 3° годен в течение 2—3 недель.

Техника. Измерение ведут при 340 *ммк* в кварцевых кюветах (толщина слоя 1 *см*, ширина 4 *мм*, объем — 1,3 *мл*); объем анализируемой жидкости 1,005 *мл*, измерение ведут против сравнительной (контрольной) кюветы.

Постановка опыта. В кювету с главным опытом и в контрольную кювету вносят пипеткой 0,100 *мл* пробы, 0,800 *мл* буферного раствора (1), 0,010 *мл* раствора $MgCl_2$ (2), 0,010 *мл* раствора глюкозы (3), 0,020 *мл* раствора нуклеозиддифосфокиназы (6), 0,020 *мл* раствора ГК (7), 0,010 *мл* раствора Г6Ф-ДГ(8), 0,025 *мл* раствора НАДФ (5). Отсчитывают экстинкцию E_1. Затем только в контрольную кювету вносят 0,010 *мл* раствора АДФ (4), каждую минуту измеряют экстинкцию, постоянное конечное значение: E_2. Разность экстинкций $\Delta E = E_2 - E_1$ входит в вычисление.

Вычисление:

$$\frac{\Delta E}{6,22} = \textit{мкмолям}\ \text{нуклеозидтрифосфата в исходной смеси},$$

где $\Delta E = E_2 - E_1$, 6,22 — коэффициент экстинкции НАДФ-H_2 (*см²/мкмоль*) при 340 *ммк*.

Анализ охватывает все содержащиеся в пробе нуклеозидтрифосфаты. Если перед прибавлением раствора НАДФ измеряют экстинкцию E_0, то разность экстинкций $E_1 - E_0$ воспроизводит содержание АТФ в пробе, а разность $E_2 - E_1$ — содержание УТФ + другие нуклеозидтрифосфаты (кроме АТФ).

Б. Определение посредством уридилтрансферазы[1]

Принцип. Уридинтрифосфат (УТФ) реагирует с глюкозо-1-фосфатом (Г-1-Ф) обратимо, посредством уридилтрансферазы реакция катализируется в сторону образования уридилдифосфоглюкозы (УДФГ) и пирофосфата, который расщепляют при помощи неорганической пирофосфатазы.

УДФГ окисляется НАД и УДФГ-дегидрогеназой в уридиндифосфоглюконовую кислоту (УДФГ). На 1 *мкмоль* УТФ образуются 2 *мкмоля* НАД-H_2. Измеряется увеличение экстинкции НАД-H_2 при 340 *ммк*.

---

[1] КФ 2.7.7.12.

Реактивы: 1) трис-буферный раствор (0,1 *М*, рН 8,5): 6,06 *г* трис-гидроксиметиламинометана растворяют в 200 *мл* дистиллированной воды, добавляют 15 *мл* 1 н. раствора HCl (рН 8,5) и доливают дистиллированной водой до 500 *мл*; 2) хлорид магния (0,5 *М* раствор)— см. стр. 278; 3) глюкозо-1-фосфат, Г-1-Ф (0,02 *М* раствор): 7,4 *мг* Г-1-Ф двукалиевой соли·$2H_2O$ растворяют в 1 *мл* дистиллированной воды; 4) никотинамидадениндинуклеотид ($2{,}5\cdot10^{-4}$ *М* раствор НАД)— см. стр. 279; 5) уридилтрансфераза, см. стр. 279; 6) УДФГ-дегидрогеназа (25 000 *ед/мл*): см. стр. 279; 7) неорганическая пирофосфатаза: раствор фермента используют неразбавленным в 0,1 *М* ацетатном буфере (рН 7) [1].

Раствор неорганической пирофосфатазы остается устойчивым при —15° в течение 6 месяцев.

Измерение ведут при 340 *ммк* в кварцевых кюветах, толщина слоя 1 *см*; объем анализируемой смеси 1,01 *мл*; измерение ведут против контрольной кюветы.

Постановка опыта. В кювету опыта и контрольную кювету вносят пипеткой: 0,10 *мл* пробы, 0,80 *мл* трис-буферного раствора (1), 0,01 *мл* раствора $MgCl_2$ (2), 0,01 *мл* раствора НАД (3), 0,01 *мл* раствора уридилтрансферазы (5), 0,02 *мл* раствора пирофосфатазы (7), 0,05 *мл* раствора УДФГ-дегидрогеназы (6). Отсчитывают экстинкцию E_1 и добавляют в контрольную кювету 0,01 *мл* раствора Г-1-Ф (3). Измеряют экстинкцию до постоянного конечного значения (E_2). Разность экстинкций $\Delta E = E_2 - E_1$ входит в вычисление.

Вычисление. На 1 *мкмоль* УТФ образуется 2 *мкмоля* НАД-H_2. Отсюда

$$\frac{\Delta E}{6{,}22\cdot2}=\frac{\Delta E}{12{,}44}=\text{мкмолям УТФ/исходная смесь,}$$

где $\Delta E = E_2 - E_1$, 6,22 — коэффициент экстинкции НАД-H_2 (*см²/мкмоль*) при 340 *ммк*.

Источники ошибок. Метод абсолютно специфичен для УТФ. Если проба содержит УДФ, то он ведет к дополнительной редукции НАД, но эта помеха исключается применением контрольной кюветы. Точность метода 1,5%.

Определение уридиндифосфоглюкуроновой кислоты

Принцип. Глюкуронозилтрансфераза катализирует реакцию:

$$\text{УДФГК} + \text{ROH} \rightarrow R\text{-глюкуронид} + \text{УДФ}. \qquad (1)$$

ROH это фенол. Определяют используемый фенол или образующийся глюкуронид. Можно использовать различные акцепторы глюкуроновой кислоты. С *о*-аминофенолом или фенолфталеином

[1] Приготовление см.: L. Heppel a. R. Kilmoe. Biochem. Prep., 1955, 4, 34.

анализ упрощается, так как микроколичества *о*-аминофенилглюкуронида можно определить в присутствии свободного *о*-аминофенола, а фенолфталеина — в присутствии глюкуронида фенолфталеина. Если проба содержит лишь немного УДФГ, то анализ проводят с *о*-аминофенолом.

После реакции между УДФГК и *о*-аминофенолом из реакционной смеси удаляют протеин и количественно анализируют образуемый *о*-аминофенилглюкуронид по методу Браттон и Маршалла, предложенному для определения сульфонамидов [1]. Если придерживаются pH 2,2, то можно пренебречь окраской, вызываемой свободным *о*-аминофенолом. Этот метод чаще всего используют при исследованиях уридиндифосфоглюкуроновой кислоты и процесса образования глюкуронида.

Реактивы: 1) глицилглициновый буферный раствор (0,02 *М*, pH 7,7): 2,65 *г* глицилглицина растворяют в 70 *мл* дистиллированной воды, 1 н. раствором KOH pH доводят до 7,7 (стеклянный электрод) и доливают дистиллированной водой до 100 *мл*; 2) хлорид калия (0,15 *М* раствор): 1,12 *г* KCl растворяют в дистиллированной воде и объем доводят до 100 *мл*; 3) хлорид магния (0,5 *М*): 10,2 *г* $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ растворяют в дистиллированной воде и объем доводят до 100 *мл*; 4) *о*-аминофенол: 8 *мг* *о*-аминофенола растворяют в 50 *мл* дистиллированной воды. Раствор готовят непосредственно перед употреблением; 5) буферный раствор глицин-трихлоруксусной кислоты (0,6 *М* глицина; 0,4 *М* трихлоруксусной кислоты: pH 2,2): 4,5 *г* глицина растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 60 *мл*; 6,5 *г* трихлоруксусной кислоты растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 40 *мл*. Растворы смешивают. Проверяют значения pH (стеклянный электрод), при необходимости pH доводят до 2,2 раствором глицина или трихлоруксусной кислоты; 6) нитрит натрия (0,1%-ный раствор): 10 *мл* $NaNO_2$ растворяют в 10 *мл* дистиллированной воды; 7) сульфанат аммония (0,5%-ный раствор): 50 *мг* $NH_4SO_3\,NH_2$ растворяют в 10 *мл* дистиллированной воды; 8) N-(1-нафтил)-этилендиамин (0,1%-ный раствор): 10 *мг* N-(1-нафтил)-этилендиаминдигидрохлорида растворяют в 10 *мл* дистиллированной воды; 9) уридиндифосфоглюкуроновая кислота (стандартный раствор 10^{-4} *М*): 1,0 *мг* УДФГК-NH^{+}_{4}-соли растворяют в 13,6 *мл* дистиллированной воды; 10) стандартный раствор *о*-аминофенилглюкуронида ($2 \cdot 10^{-4}$ *М*): 3,74 *мг* *о*-аминофенилглюкуронида растворяют в дистиллированной воде и объем доводят до 50 *мл*; 11) глюкуронозилтрансфераза: используют описанную в приложении суспензию микросом в 0,15 *М* растворе KCl (см. стр. 287).

Техника. В центрифужные пробирки вносят пипеткой 1,0 *мл* стандартного раствора *о*-аминофенилглюкуронида (10), 0,5 *мл* буферного раствора глицилглицина (1) и дистиллированную воду до объема 2,0 *мл*. Смесь в дальнейшем обрабатывают так, как глав-

---

[1] A. Bratton a. E. Marshall. J. Biol. Chem., 1939, 128, 537.

ный опыт (см. ниже), экстинкции, измеренные при 535 *ммк* против контрольного опыта, наносят на ординату против *мкмолей* *о*-аминофенилглюкуронида в главном опыте, нанесенных на абсциссе [1].

Постановка опыта. Измерение ведут при 535 *ммк*, толщина слоя 1 *см*. Анализируют опытную смесь, контроль, стандартный раствор.

В центрифужные пробирки вносят пипеткой: в одну 0,50 *мл* пробы, в другие — соответственно, дистиллированную воду для контроля и стандартный раствор УДФГК (9) для стандартного опыта; затем во все пробирки добавляют по 0,50 *мл* глицилглицинового буферного раствора (1); 0,02 *мл* раствора $MgCl_2$ (3); 0,30 *мл* раствора *о*-аминофенола (4); 0,10 *мл* суспензии микросом (9) и приливают дистиллированную воду до 2,00 *мл*. Все смеси держат в течение 30 мин. при 37°. Затем в каждую пробирку добавляют по 2,00 *мл* буферного раствора глицин/трихлоруксусной кислоты (5). Центрифугируют в течение 5 мин. при 2000 *g*. В чистые пробирки наливают пипеткой: 3,0 *мл* надосадочной жидкости, 1,0 *мл* раствора $NaNO_2$ (6), размешивают, дают стоять 3 мин., затем прибавляют 1,0 *мл* раствора $NH_4SO_3NH_2$ (7), размешивают, дают стоять две минуты и прибавляют 1,0 *мл* раствора N-(1-нафтил)-этилендиамина (3); размешивают, оставляют стоять в темноте при 25° в течение 2 час. Переливают в кюветы и измеряют экстинкцию против контроля.

Вычисление. Содержание УДФГК в исходной смеси (*мкмоли*), относящееся к измеренной экстинкции, берут по калибровочной кривой (см. [30], стр. 49). Метод специфичен для УДФГК, если суспензия микросом, используемая в качестве ферментного препарата, свободна от клеточных компонентов, остающихся в надосадочной жидкости при получении препарата. Ферментная активность препаратов варьирует немного от животного к животному, что можно контролировать при помощи стандартного раствора чистой УДФ-ГК.

Получение препарата уридилтрансферазы [2] состоит в следующем. Сухие пекарские дрожжи автолизируют и при помешивании в течение 18 час. экстрагируют двойным объемом 0,07 *М* раствора $(NH_4)_2HPO_4$ при 20°. Фракционирование сульфатом аммония.

Активные белки, выпавшие между 40 и 60% насыщения сульфатом аммония, растворяют в 0,015 *М* ацетатном буферном растворе (pH 6,3) и в течение 30 мин. проводят диализ против водопроводной воды. Затем следует осаждение неактивных сопутствующих белков в виде протаминсульфата, фракционирование этанолом при —8°. Самая активная фракция выпадает между 20 и 24% этанола. Осаждение сульфатом аммония при 60% насыщения и разведение осадка в

---

[1] Детали см. J. Storey a. G. Dutton. Bioch. J. 1955, 59, 279.
[2] Детали см.: A. Munch-Petersen. Acta chem. Scand., 1955, 9, 1523.

растворах сульфата аммония (pH 7,5) меньшей концентрации. Самую активную фракцию экстрагируют раствором сульфата аммония при насыщении от 50 до 56%. Фермент осаждают полностью и сохраняют в виде пасты при —20°.

Препарат свободен от глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (см. стр. 658), 6-фосфоглюконатдегидрогеназы, гексокиназы и фосфоглюкомутазы[1] (см. стр. 659).

Выделение уридиндифосфогалактоза-4-эпимеразы[2]. Метод состоит из следующих этапов: экстракция сухого ацетонового порошка из печени теленка водой; фракционирование экстракта при —2° ацетоном; фракционирование активного осадка при pH 8,0 раствором сульфата аммония (насыщение от 45 до 65%). Выделение осадка этой фракции ацетатным буферным раствором (pH 4,6) из раствора сульфата аммония, насыщенного до 50%, адсорбция на геле фосфата кальция. Выделение осадка из элюата раствором сульфата аммония (насыщение от 45 до 65%), растворение осадка в воде и лиофилизирование.

Выделение нуклеозиддифосфокиназы[3] состоит из следующих этапов: экстракция скелетных мышц кролика водой, 4-часовой диализ против водопроводной воды, фракционирование насыщенным раствором сульфата аммония. Более быстрый метод, который, правда, дает лишь от четверти до половины чистого препарата, состоит из разбавления первоначального экстракта 1 : 1 водой, добавления 0,05 объема 1 *М* раствора уксусной кислоты, одноминутного нагревания до 55° и осаждения активного белка при pH 6,8 (1 н. раствор NaOH).

Выделение неорганической пирофосфатазы[4]. 13-часовая мацерация сухих пекарских дрожжей в 0,1 *М* растворе NH_4HCO_3 при 34°. Фракционирование сока сульфатом аммония. Диализ растворимого в воде активного осадка. Фракционирование этанолом при pH 6,0 и —10°.

Получение препарата глюкуронозилтрансферазы. Забивают морскую свинку и дают стечь крови. Сейчас же 2 *г* печени гомогенизируют в гомогенизаторе в течение 1 мин. с 12 *мл* холодного раствора 0,15 *М* KCl (1,12 *г* KCl в 100 *мл* дистиллированной воды). Гомогенат центрифугируют в течение 15 мин. при 0° и 10 000 *g*, осадок отбрасывают. Надосадочную жидкость центрифугируют в течение 60 мин. при 0° и 35 000 *g*. Надосадочную жидкость отбрасывают, осадок микросом суспендируют в 4 *мл* ледяного раствора 0,15 *М* KCl, суспензию сохраняют при 0°. Препарат для каждого опыта приготовляют заново непосредственно перед употреблением.

---

[1] КФ 2.7.7.12.
[2] Детали см.: E. Maxwell. J. Biol. Chem., 1957, 229, 139.
[3] КФ 2.7.4.6. Детали см. P. Berg. a. W. Joklik. J. Biol. Chem., 1954, 210, 657.
[4] L. Heppel a. R. Hilmoe, 1955, 4,34.

Определение тиаминпирофосфата [25]

П р и н ц и п. В основе метода лежат две реакции: реакция (1), катализируемая пируватдекарбоксилазой [1], и реакция (2), осуществляемая ацетальдегидгидрирующей системой с участием алкогольдегидрогеназы (АДГ) [2] и НАД-H_2 (равновесие которой лежит далеко на правой стороне):

$$\text{пируват} \rightarrow \text{ацетальдегид} + CO_2, \quad (1)$$

$$\text{ацетальдегид} + \text{НАД-}H_2 + H^+ \rightleftarrows \text{этиловый спирт} + \text{НАД}. \quad (2)$$

При избытке АДГ пируватдекарбоксилирующую активность ферментного препарата можно измерять спектрофотометрически [3].

Р е а к т и в ы: 1) двузамещенный фосфат натрия (0,2 *М* раствор): 7,16 *г* $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ растворяют в бидистиллированной воде и объем доводят до 100 *мл*; 2) глицин (10%-ный в/о раствор)- 10 *г* глицина растворяют в бидистиллированной воде и объем доводят до 100 *мл*; 3) сульфат магния (0,5 *М* раствор): 12,3 *г* $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ растворяют в бидистиллированной воде и объем доводят до 100 *мл*; 4) малеиновый буферный раствор (0,2 *М*, рН 6,6): 2,32 *г* малеиновой кислоты + 70 *мл* бидистиллированной воды доводят до рН 6,6 2 н. раствором NaOH (приблизительно 18 *мл*) и доливают бидистиллированной водой до 100 *мл*; 5) пируват натрия (1 *М* раствор): 11,0 *г* пирувата натрия растворяют в бидистиллированной воде и объем доводят до 100 *мл*; 6) сульфат аммония (2,7 *М* раствор): 35,7 *г* сульфата аммония растворяют в бидистиллированной воде и объем доводят до 100 *мл*; 7) восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (около $1{,}2 \cdot 10^{-2}$ *М* раствор НАД-H_2): 10 *мг* НАД-Н-Na_2 растворяют в 1 *мл* бидистиллированной воды; 8) алкогольдегидрогеназа [4], АДГ (1 *мг* белка на 1 *мл*); обычную суспензию фермента соответственно разбавляют 2,7 *М* раствором сульфата аммония (6); 9) тиаминпирофосфат (1 *мкг* ТПФ на 1 *мл*): 1 *мг* тиаминпирофосфата растворяют в бидистиллированной воде и объем доводят до 1000 *мл*; 10) апопируватдекарбоксилаза [5] (около 1 *мг* белка на 1 *мл*): несколько *мг* апоферментной пасты на сульфате аммония растворяют в 1,0 *мл* глицинфосфатного буферного раствора [90 *мл* 0,2 *М* раствора Na_2HPO_4 (1)+ 6 *мл* раствора глицина (2)], который содержит ЭДТА в концентрации 10^{-3} *М*; для контроля ставят опыт, беря 1 *мкг* тиаминпирофосфата на кювету. Изменение экстинкции должно находиться между 0,010 и 0,040 в минуту. Если оно лежит

---

[1] КФ 4.1.1.1.
[2] КФ 1.1.1.1.
[3] Если вместо пируватдекарбоксилазы применять апокарбоксилазу (получение см. стр. 290), то скорость реакции (в присутствии ионов магния) зависит от концентрации ТПФ, что позволяет определять содержание последнего.
[4] Способ получения см. «Приложение», стр. 290.
[5] КФ 4.1.1.1.

выше, то раствор апофермента разводят далее бидистиллированной водой. В общем раствор апофермента употребляют приблизительно в концентрации 2 *мг* белка на 1 *мл*; 11) раствор аммиака (около 10%).

Техника. Измеряемая скорость реакции декарбоксилирования (1) сильно зависит от температуры, поэтому строго следят, чтобы во время опыта температура оставалась постоянной. К каждой серии анализов ставят контроль без ТПФ, и полученную величину вычитают из результатов всех анализов с ТПФ.

Сначала строят калибровочную кривую (см. стр. 286). Для этого вместо пробы берут для анализа 0,1; 0,2; 0,4 и 0,8 *мкг* ТПФ (0,1; 0,2; 0,4 и 0,8 *мл* раствора ТПФ (9)). Из найденных величин скорости реакции ΔE/*мин* вычитают величины ΔE/*мин* контроля и разность наносят на систему координат против *мкг* ТПФ.

Величина изменения экстинкции (минус контроль) лежит между 0,005 и 0,100 в минуту.

Постановка опыта. Измерение ведут при 366 *ммк*; толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 3,0 *мл*, температура измерения постоянная (!) около 25°.

В кюветы последовательно вносят (в контрольную кювету вместо ТПФ или пробного раствора дистиллированную воду): 1,5 *мл* малеинового буферного раствора (4), 0,10—1,18 *мл* раствора пробы (для калибровочной кривой раствор ТПФ(9), 0,05 *мл* Mg^{2+} (3), 0,06 *мл* НАД-H_2 (7), 0,06 *мл* суспензии АДГ (8), 0,05 *мл* раствора апофермента (10), дистиллированную воду до 2,90 *мл*. Перемешивают, оставляют стоять 30 мин. при температуре измерения; реакция начинается при вмешивании 0,10 *мл* раствора пирувата (5). Измеряют изменение экстинкции через каждые 30 сек.

Вычисление. Число *мкг* ТПФ, соответствующее ΔE/*мин* (минус ΔE/*мин* контроля), отсчитывают по калибровочной кривой. Точность метода 2%.

Приложение. Пируватдекарбоксилаза. Мацерационный сок дрожжей: 1 весовую часть сухих пивных дрожжей смешивают с 3 частями дистиллированной воды, дают стоять 3 часа при 37°, затем центрифугируют в течение 1 часа при 2000 *g*.

Осаждение ацетоном: сок охлаждают до 0°, на 100 *мл* сока добавляют 59 *мл* ацетона, дают стоять 1 час, центрифугируют, затем к каждым 100 *мл* надосадочной жидкости добавляют 15 *мл* ацетона (0°). Вновь центрифугируют и осадок суспендируют в 5%-ном растворе глицерина в воде, центрифугируют при 2000 *g* 1 час. Разбавляют 5%-ным раствором глицерина в воде до 40 *мг* белка на 1 *мл*.

Осаждение спиртом: на каждые 100 *мл* раствора добавляют 50 *мл* абсолютного спирта при 0°; в течение 15 мин. центрифугируют при 2000 *g*, затем к каждым 100 *мл* надосадочной жидкости прибавляют по каплям еще 28 *мл* этанола, центрифугируют в течение 10 мин. при 2000 *g*, осадок растворяют в 5%-ном водном растворе глицерина до 40 *мг* белка на 1 *мл*.

Осаждение сульфатом аммония[1]: на каждые 100 *мл* раствора добавляют 39,6 *г* сульфата аммония, центрифугируют при 1500 *g*, осадок суспендируют в 2,5 *М* растворе сульфата аммония до 40 *мг* белка на 1 *мл*, размешивают 30 мин. при 0°, центрифугируют 20 мин. при 6000 *g*, на каждые 100 *мл* надосадочной жидкости прибавляют 7 *г* сульфата аммония, осадок отцентрифуговывают и сохраняют в виде пасты при температуре —15, —20°.

Получение апокарбоксилазы[2] *из пируватдекарбоксилазы*. Апокарбоксилаза приготовляется путем растворения голокарбоксилазы в щелочном фосфатном буферном растворе.

При этом апофермент отщепляется от фермента. Апофермент осаждается сульфатом аммония, в то время как фермент остается в растворе и отделяется. Путем многократной промывки осадка апофермента достигают почти полного разделения. 90,0 *мл* 0,2 *М* раствора Na_2HPO_4 (1) смешивают с 6,0 *мл* 10%-ного раствора глицина (2). Доводят pH до 8,9 2 н. раствором NaOH и доливают бидистиллированной водой до 100 *мл*. Присоединяют около 2 *г* голофермента (паста на сульфате аммония) и растворяют в 3 *мл* ледяной бидистиллированной воды и этот раствор приливают к фосфатному буферному раствору. Оставляют стоять 30 мин. на ледяной бане, затем при помешивании в течение 20 мин. добавляют 45 *г* сульфата аммония. Прибавляя раствор аммиака (2), следят, чтобы во время прибавления сульфата аммония pH был не ниже 8,5. Центрифугируют 30 мин. при 20 000 *g* и сливают надосадочную жидкость. Осадок растворяют в 80 *мл* 2,7 *М* раствора сульфата аммония (6) и заново центрифугируют в течение 30 мин. при 20 000 *g*. Надосадочную жидкость сливают и осадок еще раз промывают 2,7 *М* раствором сульфата аммония (6). Отстоявшийся апофермент замораживают в центрифужном стакане при —18° в виде пасты сульфата аммония и сохраняют. Апокарбоксилаза практически свободна от ТПФ. Стойкость пасты, приготовленной на сульфате аммония,— приблизительно 3 недели[3].

Определение пиридоксальфосфата [26]

Принцип. Если реакцию

$$\alpha\text{-кетоглутарат} + \text{аспартат} \rightleftarrows \text{глютамат} + \text{оксалацетат}, \qquad (1)$$

осуществляемую трансаминазой, сочетают с реакцией

$$\text{оксалацетат} + \text{НАД-Н} + \text{H}^+ \rightleftarrows \text{малат} + \text{НАД}^+, \qquad (2)$$

протекающей в присутствии малатдегидрогеназы[4], и работают с избытком малатдегидрогеназы (МДГ), то реакция (1) лимитируется и трансаминирование может быть измерено в оптической пробе по Варбургу. Если вместо голотрансаминазы используют свободный

[1] A. Holzer и др., Bioch. Z., 1956, 327, 331.
[2] КФ 4.1.1.1.
[3] Детали см.: H. Holzer a. H. Goedde. Bioch. Z., 1957, 329, 92.
[4] КФ 1.1.1.37.

от пиридоксальфосфата апофермент, то скорость реакции системы зависит от концентрации пиридоксальфосфата в смеси опыта. С разными концентрациями пиридоксальфосфата получают характерную кривую насыщения, которая в области нижней концентрации является линейной и может быть использована как калибровочная кривая.

Реактивы: 1) диэтаноламиновый буферный раствор (0,2 *М*, pH 9,0): 2,1 *г* диэтаноламина растворяют в бидистиллированной воде и 2 н. раствором HCl доводят pH до 9,0 и затем доливают бидистиллированной водой до 100 *мл*; 2) восстановленный никотинамидадениндинуклеотид НАД-H_2 ($1{,}2 \cdot 10^{-2}$ *М* раствор): 10 *мг* НАД-Н-Na_2 растворяют в 1 *мл* бидистиллированной воды; 3) пиридоксальфосфат, стандартный раствор (0,5 *мкг/мл*): 5 *мг* пиридоксальфосфата растворяют в 100 *мл* бидистиллированной воды и 1 *мл* этого раствора разбавляют до 100 *мл*; 4) α-кетоглутарат (0,5 *М* раствор): 730 *мг* α-кетоглутаровой кислоты растворяют в небольшом количестве бидистиллированной воды, нейтрализуют 2н. раствором NaOH и добавляют бидистиллированную воду до 10 *мл*; 5) аспартат (0,5 *М* раствор): 665,5 *мг* аспарагиновой кислоты растворяют в небольшом объеме бидистиллированной воды, нейтрализуют, разбавляют бидистиллированной водой до 10 *мл*; 6) малатдегидрогеназа, МДГ (около 25 000 *ед/мл*): продажную суспензию фермента соответственно разбавляют 2,8 *М* раствором сульфата аммония; 7) апотрансаминаза (около 7000 *ед/мл*): продажный препарат соответственно разбавляют 1 *М* раствором сульфата аммония.

Техника. *Подготовка исследуемого материала.* Около 10 *г* хлебных дрожжей промывают водой, суспендируют в воде и доводят объем до 100 *мл*; 5 мин. кипятят, охлаждают до комнатной температуры и центрифугируют при 25 000 *g*. Из надосадочной жидкости для пробы используют от 0,02 до 0,10 *мл*. Ткани животных гомогенизируют с 5-кратным весом кипящей воды, выдерживают 5 мин. при 100°, охлаждают до комнатной температуры, центрифугируют. Одну часть надосадочной жидкости используют для анализа.

Строят калибровочную кривую, для чего анализируют серию от 0,01 до 0,16 *мл* стандартного раствора пиридоксальфосфата (3) (соответственно от 0,005 до 0,08 *мкг* пиридоксальфосфата). Анализ проводят, как описано ниже. Исправленные величины скорости реакций (ордината) наносят против *мкг* пиридоксальфосфата (абсцисса).

Если состав пробы неизвестен и она может содержать ингибиторы или активаторы, к стандартному раствору пиридоксальфосфата (3), используемому для калибровки, добавляют постоянный объем исследуемой пробы и такой же объем пробы прибавляют к контрольной величине.

Принципиально калибровочная кривая при каждом определении должна быть проверена путем анализа пробы с добавлением известного количества пиридоксальфосфата.

Постановка опыта. Исследуемую пробу разбавляют так, чтобы скорость реакции ΔE/*мин*, за вычетом результата контроля (не пиридоксальфосфата), лежала в линейной части калибровочной кривой.

Измерение ведут при 366 *ммк*; толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 3 *мл*, температура измерения комнатная (в течение опыта постоянная!). Измерение ведут против воды. В кюветы последовательно вносят пипеткой (в *мл*):

	Главный опыт	Контрольный опыт
Диэтаноламиновый буферный раствор (1)	3,00	3,00
Раствор НАД-H_2 (2)	0,008	0,008
Суспензия МДГ (6)	0,01	0,01
Раствор пиридоксальфосфата или раствор пробы	0,02—0,16	Соответственно H_2O
Суспензия апотрансаминазы (7)	0,01	0,01
Раствор α-кетоглутарата (4) . .	0,02	0,02

Перемешивают, отсчитывают экстинкцию через каждые 30 сек. до прекращения ее изменения или пока не станет постоянной малая убыль экстинкции. Отмечают значения для ΔE_1 за 30 сек. Реакцию трансаминазы начинают в обеих кюветах путем добавления 0,02 *мл* раствора аспарата (5). Заново измеряют от 5 до 10 мин. убыль экстинкции обеих кювет в 30-секундные промежутки: ΔE_2 за 30 сек.

Вычисление. Возобновленная реакция перед прибавлением аспартата, как и реакция трансаминазы, протекает во времени линейно.

Для вычисления результатов измерения выводят средние величины измерения ΔE_2 за 30 сек. и ΔE_1 за 30 сек. для каждой кюветы. Определяют разницу средних величин $\Delta E_2 - \Delta E_1$ за 30 сек. Получают $\Delta E_{пробы} - \Delta E_{контр}$ за 30 сек. $= \Delta E$ пиридоксаль-Р/30 сек. Эта величина характерна для скорости реакции трансаминазы, зависящей от пиридоксальфосфата. Она служит для установления концентрации пиридоксальфосфата в исследуемой пробе по калибровочной кривой.

Источники ошибок. Как и пиридоксальфосфат, пиридоксаминфосфат действует в качестве коэнзима трансаминазы. Повышение количества используемой апотрансаминазы повышает чувствительность пробы, однако количество трансаминазы ограничивается содержанием пиридоксальфосфата в ферменте. Помехи, вызываемые ингибиторами или активаторами, устраняются при помощи калибровочной кривой, построенной по данным анализа смесей исследуемого вещества с известными количествами пиридоксальфосфата. Точность метода 2%.

Приложение. *Получение апотрансаминазы из пивных дрожжей.* Все этапы проводят при температуре от 0 до 4°. а) Мацерационный сок: 70 *г* высушенных пивных дрожжей перемешивают с 210 *мл*

воды в течение 3 час. при 37°. Центрифугируют 20 мин. при 25 000 *g* и получают около 130 *мл* мацерационного сока; б) частичное температурное инактивирование: 120 *мл* мацерационного сока в течение 2 мин. при помешивании нагревают до 53—54° и 8 мин. держат при этой температуре. Затем сейчас же охлаждают на ледяной бане и центрифугируют 20 мин. при 25 000 *g*; в) первое фракционирование сульфатом аммония: к 96 *г* надосадочной жидкости медленно при непрерывном перемешивании прибавляют 32 *г* сульфата аммония. Через 20 мин. центрифугируют (20 мин. при 25 000 *g*). Надосадочную жидкость отбрасывают; остаток растворяют в 25 *мл* воды; дважды или трижды диализируют по 2 часа против 5 *л* воды, температура которой 4°; г) обработка гелем окиси алюминия: к диализату (около 32 *мл*; содержание протеина около 64 *мг/мл*) прибавляют 0,26 части объема геля окиси алюминия (сухой вес 19 *мг/мл*), ждут 10 мин. и центрифугируют в течение 20 мин. при 25 000 *g*. К надосадочной жидкости добавляют еще 0,45 части объема геля окиси алюминия. Через 10 мин. центрифугируют. Осадок суспендируют в 52 *мл* 0,4 *М* раствора сульфата аммония и через 20 мин. центрифугируют на скоростной центрифуге 25 000 *g* 20 мин. при 0°; д) второе фракционирование сульфатом аммония: к надосадочной жидкости (40 *мл*) прибавляют 8 *г* сульфата аммония, оставляют стоять 20 мин., центрифугируют в течение 20 мин. при 25 000 *g*. К надосадочной жидкости добавляют следующие 5 *г* сульфата аммония, через 20 мин. центрифугируют и остаток растворяют в воде. Получают 5 *мл* бледного желто-зеленого раствора. К нему прибавляют 1,9 *г* сульфата аммония. Медленно осаждающаяся молочная муть содержит активный ферментный белок, который в суспензии раствора сульфата аммония сохраняется при 4° в течение нескольких месяцев.

В мацерационном соке фермент наполовину насыщен пиридоксальфосфатом; основная часть его отделяется при диализе после первого фракционирования сульфатом аммония. После обработки гелем окиси алюминия в пять, шесть раз обогащенная трансаминаза без прибавления пиридоксальфосфата обнаруживает лишь только минимальную активность.

Константа Михаэлиса для пиридоксальфосфата, полученного из пивных дрожжей и обогащенного апотрансаминазой, равна $0{,}12 \cdot 10^{-6}$ *М*.

Определение креатинфосфата [27]

Принцип. Фермент креатинфосфокиназа [1] (КФК) катализирует перевод фосфата из креатинфосфата в аденозиндифосфат (АДФ) (реакция 1). Образующийся АТФ переводится гексокиназой [2] (ГК) и глюкозой в глюкозо-6-фосфат (Г-6-Ф) при обратном образовании АДФ (реакция 2). Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа [3], про-

[1] КФ 2.7.3.2.
[2] КФ 2.7.1.1.
[3] КФ 1.1.1.49.

межуточный фермент, (ПФ), катализирует дегидрирование Г-6-Ф никотинамидадениндинуклеотидфосфатом НАДФ (реакция 3).

$$\text{Креатинфосфат} + \text{АДФ} \rightleftarrows \text{креатин} + \text{АТФ} \quad (1)$$

$$\text{АТФ} + \text{глюкоза} \rightleftarrows \text{Г-6-Ф} + \text{АДФ} \quad (2)$$

$$\text{Г-6-Ф} + \text{НАДФ}^+ \rightleftarrows \text{6-фосфоглюконовая кислота} + \text{НАДФ-Н} + \text{H}^+ \quad (3)$$

$$\text{Креатинфосфат} + \text{глюкоза} + \text{НАДФ} \rightleftarrows \text{креатин} + \text{6-фосфоглюконовая кислота} + \text{НАДФ-Н} + \text{H}^+. \quad (4)$$

Как видно из итоговой реакции (4), 1 *моль* креатинфосфата образует 1 *моль* НАДФ-H_2. Измеряют увеличение экстинкции при 366 *ммк*.

Креатинфосфокиназа практически количественно превращает креатинфосфат при соответствующей концентрации АДФ и Me^{2+}.

При оптимальных условиях 1 *моль* фермента (около 80 000 *г*) образует 150 000 молей АТФ/мин. Постоянная Михаэлиса при 38° и pH от 6 до 7 для КФ равна $K_M = 5 \cdot 10^{-3}$ *М*, для АДФ: $K_M = 1 \cdot 10^{-3}$ *М*. Для реакции *1* справа налево $\Delta F'$ (при pH 7,5) около 3 *ккал*. Для образования АТФ оптимум pH креатинфосфокиназы (см. стр. 658) лежит между 6 и 7. Реакция КФК активируется ионами Mg^{2}, особенно ионами щелочноземельных металлов. Эффект уменьшается с повышением атомного веса. Активаторами являются Mg^{2+} и Mn^{2+}. Zn^{+} или Cu^{2+} замедляют реакцию. Оптимальные условия создаются, когда концентрация Mg^{2+} примерно соответствует концентрации АДФ.

Равновесие реакций гексокиназы (см. стр. 659) и промежуточного фермента (реакции 2 и 3) лежит почти полностью на правой стороне. В пределах достаточного избытка АДФ, глюкозы и НАДФ и в присутствии необходимого количества Mg^{2+} (для активации реакций КФК и ГК) связанные друг с другом ферментные реакции протекают быстро и количественно.

Реактивы (для 20 определений): 1) триэтаноламиновый буферный раствор (0,05 *М*, pH 7,5—7,6): 4,65 *г* гидрохлорида-триэтаноламина растворяют в 200 *мл* дистиллированной воды, прибавляют 11 *мл* 1н. раствора NaOH, дополняют бидистиллированной водой до 500 *мл*; 2) никотинамидадениндинуклеотидфосфат (около $7 \cdot 10^{-3}$ *М* раствор НАДФ): 7,5 *мг* НАДФ-NaH_2 растворяют в бидистиллированной воде до 1,5 *мл*; 3) хлорид магния (0,1 *М* раствор): 2,03 *г* $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ растворяют в бидистиллированной воде и объем доводят до 100 *мл*; 4) глюкоза (0,5 *М* раствор): 9,91 *г* глюкозы ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$) растворяют в бидистиллированной воде и объем доводят до 100 *мл*; 5) хлорная кислота (6%-ный в в раствор): 7,8 *мл* 70%-ной или 9,7 *мл* 60%-ной кислоты доливают бидистиллированной водой до 150 *мл*; 6) карбонат калия (около 5 *М* раствор); 7) индикатор — метилоранж: 50 *мг* метилоранжа растворяют в 100 *мл* бидистиллированной воды; 8) аденозиндифосфат (около 5 *мг/мл*): 10 *мг* АДФ-Na_3 растворяют в 2 *мл* бидистиллированной воды; 9) «цвишенфермент», промежуточный фермент, ПФ: 10—15 *мг*

лиофилизованного фермента [1] растворяют в 1 *мл* бидистиллированной воды или 0,3 *мл* суспензии фермента разбавляют дистиллированной до 1,5 *мл* (0,2 *мг* белка на 1 *мл*); 10) гексокиназа, ГК (1—10 *мг* белка на 1 *мл*): 2—20 *мг* лиофилизированного фермента растворяют в 2 *мл* бидистиллированной воды или ферментную суспензию соответственно разбавляют бидистиллированной водой; 11) креатинфосфокиназа, КФК (1—1,5 *мг* белка на 1 *мл*): 1—1,5 *мг* лиофилизированного фермента растворяют в 1 *мл* бидистиллированной воды.

Все растворы сохраняют закупоренными при 1—4°. НАДФ и раствор глюкозы готовят еженедельно, ферментные растворы из сухого порошка — ежедневно, разбавленную водой суспензию промежуточного фермента — каждые два-три дня.

Техника. *Подготовка исследуемого материала.* Тканевые пробы замораживают в доли секунды. Креатинфосфат крайне неустойчив в присутствии креатинфосфокиназы. Относительно приготовления безбелковой пробы см. стр. 263. «Определение АТФ гексокиназой».

Постановка опыта. Используемый для опыта объем пробы (V_5) устанавливают так, чтобы изменение экстинкции составляло 0,025—0,150 и реакция заканчивалась примерно через 30 мин.

Измерение ведут при 366 *ммк*; толщина слоя анализируемой смеси: а) — 1 *см*, б) — 2 *см*; объем ($V_к$) анализируемой смеси: а) 3,19 *мл*, б) 5,19 *мл*. Измерение ведут против кюветы для сравнения с 4 *мл* буферного раствора (1).

Смесь пробы (*а*) используют для определения КФ в присутствии АТФ и гексозомонофосфатов, а также для испытания на чистоту препарата КФ, определения содержания отделенного электрофоретически, хроматографически на бумаге или колонке или изолированного КФ. В кювету вносят пипеткой (в *мл*):

Безбелковая проба	0,10		
Буферный раствор	2,40		
Раствор НАДФ-H_2 (2)	0,10		
Раствор $MgCl_2$ (3)	0,10		
Раствор АДФ (8)	0,10	3 мин.; E_1	
Раствор ПФ (9)	0,02	5 мин.; E_2	$E_{ПФ_1}$
Раствор ПФ (9)	0,02	1 мин.; E_3	$E_П$
Раствор ГК (10)	0,05	15 мин.; E_4	$E_{АТФ}$
Раствор ГК (10)	0,05	1 мин.; E_5	$E_{ГК}$; $\Delta E_{АТФ/АДФ}$
Раствор глюкозы (4)	0,20	1/2 мин.; E_6	$E_{глюкоза}$
Раствор КФК (11)	0,05	15—25 мин; E_7	$E_{КФ}$
Раствор КФК (11)	0,05	1 мин.; E_8	$E_{К_{ФК}}$; $\Delta E_{КФ}$

[1] Получение см.: J. Cooper et al. Arch. Bioch. Bioph., 1958, 74, 306.

Через 1—3 мин. отсчитывают начальную экстинкцию E_1. Указанные количества фермента берут маленькой пластмассовой ложечкой и добавляют при перемешивании в раствор кюветы опыта. После первого прибавления фермента (0,02 *мл* раствора ПФ) изменение экстинкции наблюдается уже через 5 мин. (E_2) и затем в кювету добавляют еще 0,02 *мл* раствора ПФ; через 1 мин. отсчитывают контроль (E_3). Разность экстинкции $E_3 - E_2$, т. е. скачок экстинкции $E_{ПФ2}$, который вызывается прибавлением ПФ, должен быть равен разности экстинкции $E_2 - E_1 = E_{ПФ1}$.

После прибавления 0,05 *мл* ГК-раствора сообразно чистоте препаратов АДФ начинается изменение экстинкции; через 15 мин. экстинкция E_4 остается постоянной. Дальнейшее добавление 0,05 *мл* раствора ГК служит для распознавания скачка экстинкции, который вызывается раствором ГК. Отсчет проводят через 1 мин. (E_5).

$E_5 - E_4 = E_{ГК}$ вычитают из разности $E_4 - E_3 = E_{АТФ}$: $(E_4 - E_3) - (E_5 - E_4) = E_{АТФ} - E_{ГК} = \Delta E_{АТФ/АДФ}$ служит для вычисления содержания АТФ в препарате АДФ.

После прибавления раствора глюкозы, не дольше чем через 0,5 мин., наблюдается незначительная убыль экстинкции (разбавление опытного раствора, E_6).

0,05 *мл* раствора КФК вызывает превращение КФ; в большинстве случаев оно заканчивается через 15—25 мин. Изменение экстинкции контролируется до постоянного значения (E_7). Дальнейшее добавление 0,05 *мл* раствора КФК служит для распознавания скачка экстинкции, которому способствует раствор КФК. Отсчет экстинкции через 1 мин. (E_8).

$E_8 - E_7 = E_{КФК}$ вычитают из разности $E_7 - E_6 = E_{КФ}$: $(E_7 - E_6) - (E_8 - E_7) = E_{КФ} - E_{КФК} = \Delta E_{КФ}$ входит в вычисление.

Смесь пробы (*б*) используют для определения КФ в присутствии АТФ и гексомонофосфатов, а также для одновременного определения АТФ и гексомонофосфатов наряду с КФ. Этот способ применяют при анализах тканей и органов. В кювету вносят пипеткой (в *мл*):

Безбелковую пробу	0,10				
Буферный раствор (1)	4,00				
Раствор НАДФ (2)	0,10				
Раствор $MgCl_2$ (3)	0,35	3 мин.;	E_1		
Раствор ПФ (9)	0,02	5 мин.;	E_2	$E_{ГМФ}$	$\Delta E_{ГМФ}$
Раствор ПФ (9)	0,02	1 мин.;	E_3	$E_{ПФ}$	
Раствор глюкозы (4)	0,40	1/2 мин.;	E_4	$E_{глюкоза}$	
Раствор ГК (10)	0,05	15 мин.;	E_5	$E_{АТФ}$	$\Delta E_{АТФ}$
Раствор ГК (10)	0,05	1 мин.;	E_6	$E_{ГК}$	
Раствор АДФ (8)	0,05	5 мин.;	E_7	$E_{АТФ/АДФ}$	
Раствор КФК (11)	0,05	15—25 мин.;	E_8	$E_{КФ}$	$\Delta E_{КФ}$
Раствор КФК (11)	0,05	1 мин.;	E_9	$E_{КФК}$	

Через 1—3 мин. измеряют начальную экстинкцию. Указанные количества фермента берут маленькой пластмассовой ложечкой и вносят в раствор кюветы опыта. После первого прибавления фермента (0,02 *мл* раствора ПФ) уже через 5 мин. наблюдают сдвиг экстинкции (E_2), добавляют в кювету еще 0,02 *мл* раствора ПФ; через 1 мин. отсчитывают контроль (E_3). Разность экстинкции $E_3 - E_2$, а также скачок экстинкции $E_{ПФ}$, вызываемый прибавлением ПФ, вычитают из разности $E_2 - E_1 = E_{ГФМ}$; $(E_2 - E_1) - (E_3 - E_2) = E_{ГМФ} - E_{ПФ} = \Delta E_{ГМФ}$ является разностью экстинкции, соответствующей содержанию ГМФ или Г-6-Ф (при условии большой чистоты препарата ПФ).

После прибавления раствора глюкозы, не дольше чем через 30 сек., наблюдается незначительная убыль экстинкции (разбавление опытного раствора).

Добавление 0,05 *мл* раствора ГК вызывает превращение АТФ, которое в большинстве случаев заканчивается через 12 мин. Изменение экстинкции контролируют после первого прибавления ГК, беря отсчет на 15-й минуте (E_5). Дальнейшие добавления 0,05 *мл* раствора ГК служат для определения скачка экстинкции, вызываемого раствором ГК. Берут отсчет через 1 мин. после прибавления фермента (E_6)$\cdot E_6 - E_5 = E_{ГК}$; вычитают из разности $E_5 - E_4 = E_{АТФ}$: $(E_5 - E_4) - (E_6 - E_5) = E_{АТФ} - E_{ГК} = \Delta E_{АТФ}$, входит в вычисление содержания АТФ в пробе.

После прибавления 0,05 *мл* раствора АДФ экстинкция изменяется (в большинстве случаев в зависимости от чистоты препаратов); через 5 мин. отмечают E_7. Разностью экстинкции является $(E_7 - E_6) = \Delta E_{АТФ/АДФ}$, которая соответствует приблизительному содержанию АТФ в использованном препарате АДФ.

Добавлением 0,05 *мл* раствора КФК начинают реакцию КФ, которая заканчивается в большинстве случаев через 15—25 мин. Изменение экстинкции контролируют до 30-й минуты после первого прибавления КФК (E_8). Последующие добавки 0,05 *мл* раствора КФК служат для определения скачка экстинкции, который
вызывается прибавлением раствора фермента; через 1 мин. отмечают E_9; $E_9 - E_8 = E_{КФК}$ вычитают из разности $E_8 - E_7 = E_{КФ}$:
$(E_9 - E_7) - (E_9 - E_8) = K_{КФ} - E_{КФК} = \Delta E_{КФ}$ является разностью
экстинкции, соответствующей содержанию КФ в пробе.

Вычисление. При указанных условиях реакции протекают сте-
хиометрически, анализ двойных количеств безбелкового раствора
пробы дает (в пределах точности измерения) удвоенные значения
$\Delta E_{КФ}$ (и $\Delta E_{ГМФ}$ и $\Delta E_{АТФ}$).

Содержание КФ вычисляют из $\Delta E_{КФ}$ следующим образом: если
$V_к$ — объем раствора в кювете после последнего прибавления фер-
мента, V_1 — вес в *г* или объем в *мл* тканевой пробы, $V_2 - V_1 + г$ или
мл хлорной кислоты для осаждения белков, V_3 — объем хлорно-
кислого экстракта перед нейтрализацией (*мл*), $V_4 - V_3 +$ *мл*
расхода K_2CO_3 (*мл*), V_5 — объем безбелковой пробы в кювете (*мл*),
ε — коэффициент экстинкции для НАДФ; ε_{366} — 3,3 *см²/мкмоль*,

d — толщина слоя (*см*), то

$$\frac{\Delta E \cdot V_k \cdot V_2 \cdot V_4}{\varepsilon \cdot d \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot V_5} = \textit{мкмолям } \text{КФ на 1 } \textit{г} \text{ или } \textit{мл} \text{ пробы.}$$

Для тканей (печень, сердце, мышцы) принимают содержание воды 75%. Для осаждения белков в 1 *г* сырой ткани необходимо 3,25 *мл* раствора хлорной кислоты (5). Если результат анализа выражен как *мкмоль/г* ткани, то в вычисление вносят и V_1 в *г*, V_2 в *г* ткани + *мл* × 1,035 хлорной кислоты (1,035 — удельный вес 6%-ного раствора хлорной кислоты).

Если результат выражен в виде *мкмолей* КФ на 1 *мл* ткани, то вес тканевой пробы V_1/*г* делят на удельный вес ткани органа и при V_2 прибавляют объем на 1 *мл* хлорной кислоты. Для получения *мкг* КФ/*г* ткани нужно величину «*мкмоль* КФ/*г* ткани» умножить на молекулярный вес КФ (211,08).

Источники ошибок. 1. Ошибки почти всегда обусловлены содержанием в гексокиназе или в промежуточном ферменте примесей посторонних ферментов (особенно НАДФ-оксидазы, глютатион-редуктазы[1] или чрезмерным содержанием ГК в промежуточном ферменте). Большинство имеющихся в продаже препаратов ГК из дрожжей пока еще сильно варьирует по степени чистоты. Рекомендуется каждый новый препарат тщательно испытывать с кристаллическим АТФ или КФ.

2. В присутствии большого количества ионов PO_4^{3-} (например, при анализе безбелкового инкубационного раствора, содержащего буферный раствор Кребс — Рингера) в кювете часто (еще во время анализа) образуется помутнение из-за выпадающих кристаллов магний-аммоний-фосфата, что мешает правильному отсчету экстинкции.

3. Старые хранившиеся несколько дней разбавленные водой ферментные растворы непригодны. Хотя такие препараты и могут вызвать реакцию, но результаты получаются неправильные.

4. Если изменения экстинкции не прекращаются (несмотря на чистоту ферментных препаратов) долгое время, то течение экстинкции изображают графически. Экстраполяция дает возможность получить правильные величины измерения.

Креатинфосфокиназа специфически катализирует реакцию

$$\text{КФ} + \text{АДФ} \rightleftarrows \text{креатин} + \text{АТФ}.$$

В обратной реакции АТФ не может быть замещен АДФ. Инозинфосфаты не могут действовать как акцепторы или донаторы фосфата. Соединения, подобные креатину (креатинин, аргинин и др.), не фосфорилируются. Глюкоциамин замещает в обратной реакции креатин, только когда присутствует в 10-кратном избытке. Другие методы определения креатинфосфата см. [27]. Точность метода (по данным авторов) может быть доведена до 3%.

[1] КФ 1.6.7.2.

Определение органических эфиров фосфорной кислоты инсектицидного действия [28]

П р и н ц и п. Исследуемый материал экстрагируют органическим растворителем, растворитель выпаривают, а осадок инкубируют 30 мин. в забуференном растворе с известным избыточным количеством холинэстеразы (ХЭ) [1]. К концу периода инкубирования к смеси прибавляют определенный избыток ацетилхолина (АХ) и через 60 мин. определяют уксусную кислоту, освобожденную гидролизом ацетилхолина, путем измерения значения pH pH-метром.

$$\text{ХЭ} + \text{ингибитор} \rightarrow \text{ингибированная ХЭ} + \text{свободная ХЭ}; \qquad (1)$$

$$\text{АХ} \xrightarrow{\text{свободная ХЭ}} \text{уксусная кислота} + \text{холин} + \text{негидролизованный АХ}. \qquad (2)$$

Чем меньше холинэстеразы было ингибировано в реакции (1), тем больше уксусной кислоты образуется в реакции (2) в течение установленного времени гидролиза.

Р е а к т и в ы: 1) буферный раствор (pH 8,1): к 800 *мл* дистиллированной воды при помешивании прибавляют 6,647 *г* 5,5-диэтилбарбитуровой кислоты (веронал) и для растворения веронала добавляют 36 *мл* 1 н. раствора NaOH. Затем прибавляют 89,9 *г* KCl и 1,089 *г* KH_2PO_4 и, вливая около 7 *мл* 0,1н. раствора HCl, доводят pH раствора до 8,1. Дополняют дистиллированной водой до 1000 *мл* (мерная колба) и вводят 2 капли толуола; 2) хлорид натрия (0,9%-ный раствор в/о): 0,9 *г* NaCl растворяют в 100 *мл* дистиллированной воды, раствор стерилизуют (нагревают до кипения) и наполняют им стерилизованные бутылки; 3) хлорид натрия (10%-ный в/о раствор): 10 *г* NaCl растворяют в дистиллированной воде и объем доводят до 100 *мл*; 4) хлорид натрия (насыщенный раствор): 40 *г* NaCl нагревают со 100 *мл* дистиллированной воды, охлаждают до комнатной температуры, декантируют; 5) стандартный раствор ацетилхолина (0,22 *М* раствор): 4 *г* хлорида ацетилхолина растворяют в дистиллированной воде, объем доводят до 100 *мл* и добавляют 2 капли толуола; 6) холинэстераза: а) запасной раствор (около 1000 *ед/мл*); во флакон с 22 000 единиц сухой холинэстеразы вносят стерилизованным шприцем емкостью 25 *мл* 22 *мл* стерильного ледяного раствора хлористого натрия (2) (пробку флакона прокалывают), перемешивают встряхиванием. Раствор сейчас же помещают в холодильник (0—5°) (см. стр. 302 — «Определение активности раствора холинэстеразы»); б) рабочий раствор (около 20 *ед/мл*): к 1,0 *мл* запасного раствора прибавляют вычисленный по разделу «Определение активности раствора холинэстеразы» объем 0,9%-ного раствора NaCl (2). В условиях постановки опыта (см. ниже) испытуемый раствор уменьшает значение pH контрольной смеси K_2 на 2 единицы. К готовому испытуемому раствору прибавляют 2 капли толуола и сохраняют при 0—5°. Раствор ацетилхолина и буферный раствор сохраняют в холодиль

[1] КФ 3.1.1.8.

нике. Растворы холинэстеразы устойчивы при 0—5° в течение 6 месяцев без существенной потери активности.

Техника. *Подготовка исследуемого материала.* Пробу экстрагируют дихлорметаном, экстракт сгущают до 50 *мл*, промывают на делительной воронке по 10 *мл* 10%-ного раствора NaCl (3) до тех пор, пока промывной раствор будет нейтральным на лакмус.

Нейтральный экстракт фильтруют через сухой ватный тампон в мерную колбу емкостью 100 *мл*. Дополняют дихлорметаном (фильтруют через такой же ватный тампон) почти до 100 *мл*, ставят мерные колбы на 20 мин. на ледяную баню, дополняют ледяным дихлорметаном до 100 *мл* и перемешивают.

Концентрацию раствора определяют примерно следующим образом: в стакан емкостью 10 *мл* с магнитной мешалкой вносят пипеткой 2 *мл* холодного раствора пробы и высушивают в потоке воздуха, затем добавляют 3 *мл* раствора холинэстеразы (6,б) и 3 *мл* буферного раствора (1) и помещают на 30 мин на водяную баню при 25°. Добавляют 0,6 *мл* раствора ацетилхолина (5) и продолжают перемешивать при 25°, точно через 10 мин. определяют pH раствора. Измеренную величину pH вычитают из 8,0, разность умножают на 6 (10 мин.— 60 мин.). Раствор пробы разбавляют холодным дихлорметаном до содержания в нем около 0,015 *мкг* инсектицида на 1 *мл*.

Окисление инсектицида. Практически все фосфорсодержащие органические инсектициды являются тио- или дитиофосфатами. Обыкновенно эти соединения in vivo окисляются в их сульфоокислы и сульфоны, являющиеся мощными ингибиторами холинэстеразы. Для окисления инсектицида in vivo известны 4 метода, пригодные для всех ферментных методов определений. Перед ферментной реакцией нет необходимости в окислении, если определяемый инсектицид находится в окисленной форме, например ДДВФ (22-дихлорвинил-диметилфосфат), ТЭПФ (тетраэтил-пирофосфат) или параоксон (диэтил-нитрофенил-фосфат).

1. Окисление бромом или *н*-бромсукцинимидом. 0,4 *мл* насыщенной бромной воды приливают к 100 *мл* дистиллированной воды. 1 *мл* этого раствора прибавляют к высушенному дихлорметановому экстракту исследуемого материала, непосредственно перед соединением буфера и фермента. Степень содержания брома в бромной воде не имеет значения.

Бром реагирует с большинством тиофосфатов немедленно. Некоторые соединения, как деметон (*о,о*-диэтил-*о*-[2-(этилтио)-этил]-тиофосфат) или сульфотепп(тетраэтил-дитиопирофосфат), составляют исключение тем, что они, помимо бромной воды, окисляются еще и *н*-бромсукцинимидом в водном растворе в ингибитор холинэстеразы. Однако они окисляются медленно *н*-бромсукцинимидом в хлороформе, в четыреххлористом углероде или 1.1.1-трихлорэтане. В этом случае к сухому остатку дихлорметанового экстракта прибавляют 1 *мл* раствора из 25 *мг* *н*-бромсукцинимида в 100 *мл* одного из названных растворителей. Оставляют стоять 5 мин. при ком-

натной температуре, прибавляют 1 *мл* 0,02%-ного хлороформного раствора фенола, растворитель выпаривают, к осадку прибавляют буфер и ферментный раствор, как описано в постановке опыта.

2. **Окисление смесью H_2O_2 уксусная кислота.** Исследуемый материал экстрагируют бензолом. К 5 *мл* экстракта (в пробирке с притертой пробкой) приливают 3 *мл* свежеприготовленной смеси из 30% H_2O_2 и уксусной кислоты (1 : 5 о/о), прибавляют пемзы, пробирку закупоривают, немного встряхивают; удаляют пробку, 20 мин. нагревают при 75°, затем охлаждают на ледяной бане. Добавляют 5 *мл* дистиллированной воды, пробирку закрывают, хорошо встряхивают. Если фазы разделились, часть слоя бензола забирают пипеткой в колбу емкостью 10 *мм*, прибавляют каплю парафинового масла, хорошо перемешивают, бензол выпаривают. Осадок используют для анализа.

3. **Окисление азотной кислотой.** 5 *мл* дихлорметанового экстракта высушивают в круглодонной колбе емкостью 125 *мл*, остаток охлаждают на ледяной бане и осторожно смешивают с 10 *мл* смеси, состоящей из концентрированной HNO_3 и дымящей HNO_3 (1 : 1 о/о). Стенки сосуда смачивают раствором, сосуд вынимают из ледяной бани, оставляют стоять 5 мин. при комнатной температуре, осторожно добавляют 25 *мл* холодной дистиллированной воды, раствор наливают в делительную воронку емкостью 125 *мл*. Сосуд дважды промывают дихлорметаном, каждый раз по 25 *мл*, промывную жидкость сливают через делительную воронку. Хорошо встряхивают, водную фазу дистиллируют и отбрасывают. Фазу дихлорметана промывают 10%-ным раствором $NaHCO_3$, порциями по 10 *мл*, пока промывная жидкость дает щелочную реакцию на лакмусе. Наконец, дважды промывают насыщенным раствором NaCl (4), фазу дихлорметана отфильтровывают через маленький сухой ватный тампон в мерную колбу емкостью 100 *мл*. Делительную воронку дважды промывают дихлорметаном порциями по 20 *мл*, промывную жидкость фильтруют через тот же ватный тампон в измерительную колбу. Дополняют дихлорметаном до 100 *мл*. Анализируют одну аликвоту.

4. **Окисление надбензойной кислотой.** Бензольный раствор окислителя приготовляют по [29] и анализируют. Непосредственно перед применением разбавляют 5 *мл* бензольного раствора дихлорметана до 50 *мл*. 5 *мл* разбавленного раствора прибавляют к 50 *мл* инсектицидсодержащего экстракта. Растворы хорошо перемешивают, 15 мин. держат на водяной бане при 15° и затем вливают в делительную воронку емкостью 250 *мл*. Сосуд дважды промывают дихлорметаном по 20 *мл* каждый раз, промывную жидкость сливают в делительную воронку. Раствор промывают один раз 75 *мл* свежеприготовленного 0,5%-ного раствора $Na_2S_2O_5$ и дважды по 75 *мл* насыщенного раствора NaCl (4). Фазу дихлорметана фильтруют через небольшой слой ваты с небольшим количеством безводного сульфата натрия в мерную колбу емкостью 200 *мл*, дополняют дихлорметаном до 200 *мл*, анализируют аликвоту.

Определение активности запасного раствора холинэстеразы

Все растворы реактивов во время анализа хранят на ледяной бане (при внесении пипеткой ядовитых растворов не отсасывают ртом!). Стеклянные сосуды очищают горячей бихроматсерной кислотой, основательно промывают водой, высушивают при 100° в сушильном шкафу.

Стерильным, охлажденным шприцем емкостью 2 *мл* сначала отмеривают немного более 1 *мл* ледяного запасного раствора холинэстеразы (6, а). Иголку наполненного шприца вкалывают в чистую резиновую пробку, чтобы закрыть отверстие иголки. Удаляют из шприца поршень, пипеткой отбирают 1,0 *мл* раствора и переносят его в колбу емкостью 50 *мл*.

Доливают ледяным 0,9%-ным раствором NaCl (2) до 50 *мл* и перемешивают. Полученный таким путем разбавленный раствор холинэстеразы содержит около 20 *ед/мл*.

В колбу емкостью 10 *мл* вносят пипеткой: 2 *мл* ледяного 0,9%-ного раствора NaCl (2) и 3 *мл* ледяного буферного раствора (1). Колбу ставят на водяную баню с температурой 25 ± 0,5°, содержимое перемешивают магнитной мешалкой.

Во вторую колбу вливают пипеткой 3 *мл* ледяного раствора холинэстеразы и 3 *мл* ледяного буфера (1). Точно через 2 мин. после того как первую колбу поставили на водяную баню, аналогично ставят на водяную баню (25 ± 0,5°) вторую колбу. Содержимое ее также перемешивают магнитной мешалкой.

Третью колбу наполняют, как и вторую; точно через 2 мин. после второй колбы ставят на водяную баню (25 ± 0,5°), содержимое перемешивают магнитной мешалкой.

Каждую колбу выдерживают на водяной бане точно 30 мин. Снимают первую колбу и сейчас же определяют pH, который должен составлять 8,00 ± 0,05.

По истечении 30 мин. нагревания на водяной бане при 25° во вторую и третью колбы прибавляют 0,6 *мл* ледяного стандартного раствора ацетилхолина (5) и оставляют на водяной бане (25 ± 0,5°) точно на 60 мин., после чего измеряют величины pH. Они должны согласовываться в пределах значения pH 0,02. Выводят среднюю величину.

Калибровочная кривая. Для вычисления результата опыта для каждого инсектицида необходима калибровочная кривая. Работают как указано в постановке опыта, однако вместо раствора пробы используют растворы разной концентрации чистого инсектицида в дихлорметане. Как указано в пункте «Вычисление», для каждого раствора определяют процент ингибирования и наносят эту величину на абсциссу (разделенную линейно) против мкг инсектицид/смесь пробы (ордината, разделенная логарифмически).

Постановка опыта. Отмечают пипетки, используемые для отмеривания растворов холинэстеразы, буфера и ацетилхолина.

При пипетировании не задевать стенок реакционного сосуда — колбы. Указанное время реакций должно точно соблюдаться, так

как принцип определения заключается в измерении скоростей реакции.

Температура инкубации 25 ± 0,5°; для каждого анализируемого объекта ставят два контрольных опыта (К1 и К2), не содержащих пробу. 10 пронумерованных химических стаканов (по 20 *мл*) ставят под вытяжку, каждый стакан снабжают магнитной мешалкой и вносят пипеткой следующие растворы:

	№ стакана	Раствор инсектицида (0,015 *мкг/мл*), *мл*	CH_2Cl_2, *мл*
Контроль К1	1	—	8
	2	1	7
	3	2	6
	4	3	5
Анализируемые смеси	5	4	4
	6	5	3
	7	6	2
	8	7	1
	9	8	0
Контроль К2	10	—	8

Без нагревания все растворы высушивают в легкой струе воздуха вентилятора при помешивании магнитной мешалкой. Обыкновенно это длится 10 мин. Во все смеси последовательно вливают из пипетки с промежутком точно 2 мин. 3 *мл* холодного буферного раствора (1) и 3 *мл* раствора холинэстеразы (см. стр. 299) (6,*б*). Каждый стакан ставят на водяную баню (25 ± 0,5°) и помешивают. Точно через 30 мин. первый стакан (К1) снимают с водяной бани, измеряют pH раствора (предварительно споласкивают микроэлектроды pH-метра дистиллированной водой и вытирают платком или тонкой поглощающей бумагой). Измеренная величина pH (8,00 ± 0,05) обозначается $(pH)_{K1}$ и может рассматриваться как начальный pH всех остальных растворов.

После снятия первого стакана с водяной бани через промежутки времени (равные точно 2 мин.) в К2 и в опытные смеси вливают пипеткой по 0,6 *мл* раствора ацетилхолина (5). Каждый стакан еще точно 60 мин. держат при 25 ± 0,5° (работает магнитная мешалка). По истечении этого времени измеряют значения pH, которые обозначают $(pH)^{60}_{K2}$ или $(pH)^{60}_{проба}$.

Вычисление. Из значений pH вычисляют ингибирование холинэстеразы в опытных смесях по формуле:

$$\frac{\left((pH)^{0}_{K1}-(pH)^{60}_{K2}\right)-\left((pH)^{0}_{K1}-(pH)^{60}_{пр}\right)}{(pH)^{0}_{K1}-(pH)^{60}_{K2}}\cdot 100=\text{процент ингибирования},$$

где $(pH)^{0}_{K1}$ pH контрольной смеси К1 (без ацетилхолина) перед началом инкубации с ацетилхолином.

$(pH)^{60}_{K2}$ pH контрольной смеси К2 после окончания инкубации с ацетилхолином.

$(pH)^{60}_{пр}$ pH опытной смеси после окончания инкубации с ацетилхолином.

Относящиеся к вычислению ингибирования концентрации инсектицида в *мкг*/смесь опыта берут по калибровочной кривой.

Ферментативные методы определения органических фосфатов инсектицидного действия группируются на: а) электрометрические, б) титрометрические, в) манометрические и г) колориметрические.

Отдельные колориметрические методы требуют хромогенных веществ, которые при гидролизе холинэстеразы или родственных эстераз образуют сильно красящие продукты. При постоянной концентрации субстрата интенсивность окраски зависит от активности фермента. Кроме того, имеются методы, допускающие определение потери активности холинэстеразы в крови после воздействия паратиона или других органических фосфатов инсектицидного действия. Соответствующую литературу см. [28].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Hohorst H.* Dissert. Universität Marburg, 1960.
1a. *Negelein E.* В кн. Colowick S., Kaplan N. Methods in Enzymology. N. Y., 1957, **3**, 216.
2. *Krimsky S.* В кн. Bergmeyer H. Methoden d. enzymatischen Analyse. Weinheim, 1962, 238.
3. *Hohorst H.* Bioch. Z, 1957, **328**, 509.
4. *Nigam V.* Canad. J. Bioch., Physiol., 1962, **40**, 836.
5. *Horecker B.* et al. J. Biol. Chem., 1955, **212**, 827.
6. *Racker E., Schroeder E.* Arch. Bioch. Bioph., 1958, **74**, 326.
7. *Cooper J.* er al. Arch. Bioch., Bioph. 1958, **74**, 306.
8. *Couri D., Racker E.* Arch. Bioch. Bioph., 1959, **83**, 195.
9. *Racker E., Schroeder E.* Arch. Bioch. Bioph., 1958, **74**, 326.
10. *Bergmeyer H.*, см. [2], 131.
11. *Srere P.* et al. Arch. Bioch. Bioph., 1958, **74**, 295.
12. *Cooper J.* et al. Arch. Bioch. Bioph., 1958, **74**, 306.
13. *Racker E.* Arch. Bioch. Bioph., 1957, **69**, 300.
14. *Racker E.* В кн. Colowick S., Kaplan N, 1962, Methods in Enzymology. Acad. Press, N. Y., **5**, p. 244.
15. *Cooper J.* et al. см. [12].
16. *Cooper J.* et al. см. [12].
17. *Adam H.* В кн. Bergmeyer. H., см. [2], стр. 539.
18. *Lamprecht W., Trautschold J.* Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 1958, **311**, 245.
19. *Strehler B., Totter J.* В кн. Glik D. Methods of Biochemical Analysis. N. Y., 1954, **3**, 341.
20. *Scott N., Falconer J.* Anal. Bioch., 1965, **13**, 71.
21. *Rall T., Sutherland E.* J. Biol. Chem., 1958, **232**, 1065.
22. *Adam H.* Dissert. Universitat Marburg L., 1955.
23. *Möllering H., Bergmeyer H.* В кн. Bergmeyer H., см. [2], стр. 578.
24. *Mills T.* u. *Smith E.* см. [2], 581.
25. *Holzer E.* et al. см. [2], 602.
26. *Holzer E.* et al. Bioch. Z., 1958, **329**, 529.
27. *Lamprecht W., Stein Ph.* Bioch. Z., 1958, **329**, 610.
28. *Giang P.* В кн. Bergmeyer H., см. [2], стр. 617.
29. *Braun G.* Organ. Syntheses, Coll., 1941, **1**, 431.
30. *Асатиани В. С.* Новые методы биохимической фотометрии. М., изд-во «Наука», 1965, стр. 388.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ И ДРУГИХ АЗОТИСТЫХ ВЕЩЕСТВ

Расщепление белков до пептидов [1]

Методы расщепления белков с применением трипсина[1]

П р и н ц и п. Высокая специфичность этого фермента делает возможным получение фрагментов белка вполне определенной природы. Трипсин всегда расщепляет пептидные связи там, где имеются основные аминокислоты — лизин или аргинин, и именно таким образом при этом освобождается карбоксильная группа этих аминокислот. Вследствие этого получаются пептиды, у которых концевой является определенная аминокислота (лизин или аргинин). До сих пор были известны два исключения: трипсин не расщепляет, 1) если α-аминогруппа лизина или аргинина свободна или 2) если в пептидной цепи за лизином следует аминокислота пролин.

Если белок нельзя расщепить непосредственно ферментативным путем или он расщепляется не полностью, то соответствующей обработкой его можно подготовить к ферментативному гидролизу. Это достигается посредством разворачивания молекулы белка в 6—8 *M* растворе мочевины или в 2 *M* растворе гуанидингидрохлорида и разрывом дисульфидных мостиков. Последнее удается 1) окислением надмуравьиной кислотой (при окислении разрушается триптофан), 2) восстановлением тиоленов в тиогликол, посредством натрий боргидрида с последующей реакцией превращения сульфгидрильных групп в остатки карбоксиметила или посредством обработки сульфитом с образованием тиосульфоновых кислот.

Белки при оптимальных условиях действия трипсина (pH 7,8) в буферном растворе или, при работе без солей, в автоматическом титраторе расщепляются обычно при комнатной температуре. Образующиеся пептиды разделяют либо на ионите (например на Дауэкс 50 × 2), либо хроматографически, либо при помощи электрофореза на бумаге. Изящен способ двухмерного разделения на бумаге, при котором в одном измерении разделение осуществляют электрофорезом, а в другом — хроматографией («отпечаток пальцев»).

Чистота ферментного препарата. Обычный продажный трипсин в большинстве случаев содержит незначительные примеси

[1] КФ 3.4.4.4.

химотрипсина[1] и эластазы[2]. Поэтому желательно исходить из хроматографически чистого трипсиногена, который активируется перед опытом небольшим количеством трипсина и перекристаллизовывается. Часть химотриптической активности может быть устранена посредством добавления такого количества диизопропилфлуорфосфата, чтобы приблизительно 50% триптической активности было блокировано, или же трипсин инкубируют с 1/16 н. раствором HCl в течение 24 час. при 37°. Еще одна возможность: трипсин растворяют в 8 *М* растворе мочевины, оставляют стоять несколько часов и разводят затем до 2 *М* концентрации мочевины (активность трипсина более обратима, чем активность побочных веществ). Этот метод применим чаще всего, когда расщепляемый белок обработан мочевиной. Трипсин расщепляют еще и в 2 *М* растворе мочевины.

Реактивы: 1) фосфатный буферный раствор (0,2 *М*, pH 7,0): 8,28 *г* $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ и 19,88 *г* безводного Na_2HPO_4 растворяют в дистиллированной воде, доводя объем раствора до 1000 *мл*; 2) нингидриновый реактив: 20 *г* нингидрина и 3 *г* гидриндантина растворяют в 750 *мл* свободного от перекиси монометилового эфира, этиленгликоля, добавляют 250 *мл* 4 *М* ацетатного буферного раствора pH 5,5(544,0 *г* ацетата натрия $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ и 100 *мл* ледяной уксусной кислоты доливают дистиллированной водой, после растворения. до 1000 *мл*). Красноватый раствор сохраняется под азотом в темноте. Приготовляют не более недельного запаса; 3) трипсин (0,05% белка): 50 *мг* свободного от соли трипсина растворяют в фосфатном буферном растворе (1) до 100 *мл*. Раствор готовят свежим для каждого анализа.

Проведение работы и материал исследования. Расщепляемый материал растворяют в фосфатном буферном растворе (1) до получения 1%-ного раствора (в/о).

Постановка опыта. Для проведения реакции с нингидрином и для определения продуктов аутолиза трипсина вместо опытной пробы проводят пустой опыт с фосфатным буферным раствором (1).

Ферментативный гидролиз. В круглодонную колбу 50 *мл* (водяная баня 37°) отмеривают пипеткой: 10 *мл* раствора расщепляемого материала и 10 *мл* раствора трипсина (3)[3] и смешивают. Через 0; 20; 40; 60; 120; 240 и 360 мин. из смеси отбирают по 0,1 *мл* пробы. С ними проводят нингидриновую реакцию (см. ниже). Если количество нингидринположительных веществ больше не прибавляется, реакцию приостанавливают посредством 2 *мл* 2н. раствора HCl; значение pH должно быть 2,2; после этого исследуемую смесь можно перенести непосредственно в колонку с ионитом для определения образовавшихся пептидов. Детали см. [1].

---

[1] КФ А — 3.4.4.5; В 3.4.4.6.
[2] КФ — 3.4.4.7.
[3] Перевариваемая проба (расщепляемый белок + фермент) является 0,5%-ным раствором в отношении расщепляемого белка и 0,025%-ным в отношении фермента (отношение веса расщепляемого белка к весу фермента равно 20 : 1).

Реакция с нингидрином. Измерение ведут при 570 *ммк*, толщина слоя 1 *см*. Измерение проводят против пустого опыта (см. выше).

Отмеривают пипеткой в пробирки (закупориваемые пробками): 0,1 *мл* пробы из ферментной смеси после отделения пептидов на ионитах (расщепляемый материал + фермент), 1,0 *мл* нингидринового реактива (2) точно 15 мин. нагревают в кипящей водяной бане, прибавляют 5,0 *мл* 50%-ного этанола, перемешивают, дают остыть при комнатной температуре, измеряют экстинкцию. При очень высоких экстинкциях можно развести раствор 50%-ным этанолом.

Процесс ферментативного гидролиза контролируется при помощи образования нингидрин-положительных веществ. Когда количество их больше не увеличивается, это значит, что расщепление закончилось (для развития окрашивания требуется время).

Расщепление в бессолевом растворе. Если имеется автоматический прибор для титрования и если пептиды должны быть обработаны методами, при которых нелетучие соли мешают, то расщепляют в растворе, содержащем только летучие соли [1]. Процесс триптического расщепления контролируют, следя за расходом щелочи.

Приготовление растворов: 1) триэтиламин (0,1 *М*): 1,01 *г* триэтиламина смешивают с дистиллированной водой до 100 *мл*; 2) трипсин (0,5%-ный раствор белка): 50 *мг* свободного от солей трипсина растворяют в дистиллированной воде, при помощи 0,1 *М* раствора триэтиламина доводят pH до 8 и доливают дистиллированной водой до 100 *мл*. Раствор готовят свежим к каждому опыту.

Техника. *Материал исследования*. Расщепляемый бессолевой белок растворяют в дистиллированной воде с образованием 0,5—1%-ного раствора (в/о), pH этого раствора устанавливают муравьиной кислотой или 0,1 *М* раствором триэтиламина равным 8,0.

Постановка опыта. Пустой опыт с водой с pH 8,0, установленным посредством триэтиламина, вводят вместо пробы. Он служит для определения расхода щелочи на поглощение CO_2 из воздуха во время опыта.

В сосуде для проведения титрования (автотитратор), установленном на 37°, смешивают: 10 *мл* пробы и 10 *мл* раствора трипсина (2) [2], перемешивают, при помощи 0,1 *М* раствора триэтиламина автоматически устанавливают pH 8,0. Через каждые полчаса отмечают количество израсходованного раствора. Опыт прекращают, когда расходование щелочи будет вызвано только поглощением им CO_2 из воздуха (пустой опыт).

Образовавшиеся пептиды могут быть непосредственно разделены хроматографически на бумаге после высушивания замораживанием; содержащиеся в испытуемой пробе соли являются летучими.

---

[1] G. Dixon et al. J. Biol. Chem., 1958, **233**, 1373.

[2] Перевариваемая проба (ферментируемая смесь, т. е. расщепляемый белок + +фермент) является 0,25—1,0%-ной в отношении субстрата (т. е. расщепляемого белка) и 2%-ной в отношении трипсина.

Метод расщепления белков при помощи химотрипсина

Принцип. Специфичность химотрипсина не так высока, как специфичность трипсина. Известно, что химотрипсин расщепляет белки по месту пептидных связей, в образовании которых участвуют карбоксильные группы ароматических аминокислот — таких, как фенилаланин, тирозин и триптофан.

Однако фермент обладает способностью отщеплять также и остатки тех аминокислот полипептидной цепи, которые имеют расположение, сходное с таковым ароматических аминокислот. Таким путем изолированы пептиды, содержащие в качестве конечной карбоксильную группу неароматических аминокислот — лейцина, валина, метионина, глютаминовой кислоты, аспарагина, глютамина и гистидина. Остатки, содержащие ароматические аминокислоты, всегда расщепляются ферментом, поскольку они не являются *N*-концевыми; расщепление «неароматических» остатков он вызывает только иногда. Оптимум эффективности химотрипсина находится при pH 8,0, однако расщепление им возможно также и при pH7.

Техника расщепления химотрипсином та же, что и трипсином (см. стр. 306). Можно работать в буферном или в бессолевом растворе.

Кроме фосфатного буферного раствора, с успехом применялся буферный раствор 0,2 *M* ацетата аммония (pH 8,5). Этот буферный раствор имеет то преимущество, что соль можно сублимировать в вакууме и получить, таким образом, бессолевую смесь пептидов. Однако в этом случае за расщеплением нельзя следить при помощи нингидринового метода (из-за аммиака).

Химотрипсин (см. стр. 658) обладает почти всегда небольшой триптической активностью. Поэтому следует считаться с появлением «триптических пептидов». В этих случаях следует рекомендовать хроматографическую очистку [1] химотрипсина или химотрипсиногена и его последующую активизацию в химотрипсин.

Реактивы (см. «Трипсин», стр. 306).

Техника (см. «Трипсин», стр. 306).

Метод расщепления белков пепсином [2]

Принцип. По сравнению с трипсином специфичность этого фермента не очень велика. Синтетические «ароматические» субстраты он расщепляет на ароматические аминокислоты и таким образом, что освобождается их аминная группа. Большинство белков, исследованных до настоящего времени, гидролизируется пепсином лишь частично (не полностью). Часто от аминового или карбоксильного конца отщепляются только пептиды. Реакция протекает большей частью не количественно. Очень быстро и количественно расщеплению подвергаются те пептидные соединения, которые не содержат

---

[1] C. Hirs. J. Amer. Chem. Assoc., 1955, 77, 5743.
[2] КФ 3.44.2.

ароматических аминокислот, в то время как соединения пептидов с ароматическими аминокислотами вовсе не поддаются действию фермента. Несмотря на это, пепсин можно применять для структурных исследований, так как важен каждый новый пептид, облегчающий выяснение последовательности соединения аминокислот в белке. Оптимум эффективности лежит при pH 2 для расщепления белков, в то время как многие синтетические субстраты расщепляются оптимально при pH 4.

Чистота кристаллических продажных препаратов в общем достаточна. Специфическая активность должна составлять около 0,033 *ед/ мг*.

Р е а к т и в ы: 1) буферный раствор цитрата (0,2 *М*, pH 2,2): 21,0 *г* лимонной кислоты и 8,4 *г* едкого натра растворяют в дистиллированной воде, добавляют 16,0 *мл* концентрированной HCl, доливают дистиллированной водой до 1000 *мл*, в случае необходимости устанавливают значение pH на стеклянном электроде равным 2,2; 2) раствор едкого натра (0,1 н.): 4 *г* NaOH растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 1000 *мл*; 3) нингидриновый реактив (приготовление см. стр. 306); 4) соляная кислота (0,1 н.): 1 *мл* концентрированной HCl разводят дистиллированной водой до 1000 *мл*, определяют концентрацию посредством разведенного 1 : 10 раствора (2); 5) пепсин (около 0,1% в/о белка): 50 *мг* пепсина растворяют в цитратном буферном растворе (1) и доливают тем же раствором до 50 *мл*. Приготовляют свежий раствор перед каждым опытом.

Т е х н и к а. *Материал исследования.* Расщепляемый материал растворяют в цитратном буферном растворе (1) или в 0,01 н. HCl (4) до получения 1%-ного раствора в/о.

Постановка опыта. Пустой опыт и опыт «переваривания» при 37° проводят, как описано для трипсина на стр. 306. После окончания расщепления добавляют 0,1 н. раствора NaOH (2) до pH 7,0.

Методы расщепления белка другими протеазами

Иногда применяют и другие протеолитические ферменты. Например, субтилизином удается при кратком воздействии на рибонуклеазу [1] расщепить только одну связь этого белка. Папаин расщепляет несколько связей, в качестве субстрата применяют бензоиларгининамид. При выяснении структуры рибонуклеазы папаин служил для расщепления пептида, который не поддавался расщеплению трипсином, химотрипсином и пепсином. Применимость эластазы была исследована на В-цепь инсулина.

П о с т е п е н н о е р а з р у ш е н и е п е п т и д о в и б е л к о в к а р б о к с и п е п т и д а з о й [2] и л е й ц и н а м и н о п е-

---

[1] КФ 2.7.7.16.
[2] Карбоксипептидаза дрожжей 3.4.2.3. АКФ 3.4.2.1.

птидазой[1]. Пептиды, полученные, например, триптическим расщеплением белка, и белки под влиянием этих ферментов постепенно деструктируются, причем разложение протекает с карбоксильного или аминового конца.

Принцип. Карбоксипептидаза и лейцинаминопептидаза как типичные экзопептидазы отщепляют одну за другой кислоты с карбоксильного или аминного конца:

карбоксипептидаза

$$-NH-CH(R^1)-CO-NH-CH(R^2)-COOH + H_2O \rightarrow$$

$$\rightarrow -NH-CH(R^1)-COOH + H_2N-CH(R^2)-COOH;$$

лейцинаминопептидаза

$$H_2N-CH(R^3)-CO-NH-CH(R^4)-CO-NH- + H_2O \rightarrow H_2N-CH(R^3)-COOH + H_2N-CH(R^4)-CO-NH-$$

Если следить за временем постепенного ферментативного гидролиза, то можно получить представление о последовательности соединения аминокислот в пептиде или белке. Берут пробы из реакционной смеси и определяют появляющиеся аминокислоты качественно и приблизительно количественно. При этом сперва появляется концевая аминокислота, затем вторая (перед третьей) и т. д. Полуколичественное определение концентрации продуктов расщепления в различные отрезки времени позволяет уточнить их природу.

Карбоксипептидаза[2]. Для определения активности субстратом служит карбобензоксиглицилфенилаланин; протеолитический коэффициент[3] C_1 должен быть по меньшей мере равен 10. Перед началом опыта кристаллы фермента промывают дистиллированной водой на центрифуге для удаления свободных аминокислот и повторно готовят взвесь в 1%-ном растворе $NaHCO_3$ с концентрацией 1 *мг* белка на 1 *мл*, к которой добавляют диизопропилфторфосфат (ДФФ), чтобы уменьшить влияние загрязнений трипсином, химотрипсином и т. д.[4]

[1] КФ 3.4.1.1.

[2] Относительно модификации карбоксипептидазного метода см. В. С. Асатиани. Новые методы биохимической фотометрии. М., изд-во «Наука», 1965, стр. 70.

[3] $C_1 = \frac{K_1}{E}$, где E — количество фермента в *мг*, K_1 — константа реакции (I порядка).

[4] J. Lens. Bioch. Bioph. Acta, 1949, 3, 367.

Лейцинаминопептидаза: для определения активности служит лейцинамид.

Реактивы: 1) фосфатный буферный раствор (1 *M*, pH 8,0). 179,08 *г* $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ растворяют в бидистиллированной воде, доливают до 1000 *мл*, устанавливают pH, добавляя приблизительно 60 *мл* раствора 138 *г* $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ в 1000 *мл* бидистиллированной воды до pH 8,0 (стеклянный электрод); 2) трис-буферный раствор (0,2 *M*, pH 8,3): 24,3 *г* трис-гидроксиметиламинометана растворяют в 800 *мл* бидистиллированной воды, устанавливают pH приблизительно 20 *мл* концентрированной HCl равным 8,3 (стеклянный электрод) и доливают бидистиллированной водой до 1000 *мл*; 3) буферный раствор фосфата (0,1 *M*, pH 8,3): 35,8 *г* $Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$ растворяют в 800 *мл* бидистиллированной воды, устанавливают приблизительно pH 20 *мл* концентрированной HCl до 8,3 и доливают бидистиллированной водой до 1000 *мл*; 4) аммиак (5н.): около 25 *мл* концентрированного аммиака разводят бидистиллированной водой до 100 *мл*; устанавливают его концентрацию 1 н. раствором HCl; 5) трис-буферный раствор (около 0,005 *M*, pH 8,0; 0,005 *M* $MgCl_2$). 607 *мг* трис-гидроксиметиламинометана и 1,016 *г* $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ растворяют в 900 *мл* бидистиллированной воды, из которой кипячением удалены газы, устанавливают значение pH посредством 0,1 н. HCl равным 8,0, доливают дистиллированной водой до 1000 *мл*; 6) диизопропилфторфосфат, ДФФ (0,1 *M*); нужно быть осторожным, предотвратить вдыхание даже ничтожных следов пара.

Противоядие — атропин [1]. Пришлифованной пипеткой или баллоном для всасывания 1 *г* ДФФ вносится в 54,5 *мл* абс. изопропанола, перемешивается; 7) хлорид марганца (1 *M*): 19,8 *г* $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ растворяют в бидистиллированной воде, объем доводят до 100 *мл*; 8) трис-буфер (0,5 *M*, pH 8,5): 6,05 *г* трис-гидроксиметиламинометана растворяют в 50 *мл* бидистиллированной воды, значение pH доводят добавлением приблизительно 5 *мл* концентрированной HCl до 8,5 (стеклянный электрод) и доливают бидистиллированную воду до 100 *мл*; 9) распыляющиеся реактивы (реактивы для пульверизации): 250 *мг* нингидрина растворяют в 95 *мл* насыщенного водой *н*-бутанола и прибавляют 5 *мл* коллидина; 10) карбоксипептидаза (6 *мг* белка на 1 *мл*): кристаллы из 1 *мл* суспензии растворяют в растворе $NaHCO_3$ при добавлении 0,05—0,1 *мл* 0,1 н. NaOH (pH 10) при легком помешивании. Посредством 0,1 *мл* фосфатного буферного раствора (3) или 0,1 н. HCl pH доводят (pH-метром) до 7,8—8,3. На 1 *мг* фермента прибавляют 0,015 *мл* раствора ДФФ, после одночасового хранения в покое при 25° раствор готов к употреблению. Если понадобится большое количество кристаллов фермента, то их размешивают с холодным 10%-ным раствором LiCl [2]. Объем подбирают так, чтобы концентрация LiCl в опыте составляла 0,5—1%. На 1 *мл* прозрачного раствора прибавляют 10^{-8} *молей*

[1] Руководство по фармакологии. Под ред. Н. Ф. Лазарева. М., Медгиз, 1961, т. 1, стр. 219.

[2] J. Gladner a. H. Neurath. J. Biol. Chem., 1953, 205, 345.

ДФФ (неразведенного вещества) и хранят при 0°; 11) лейцинаминопептидаза, ЛАП (60 *мг* белка на 1 *мл*): на 1 *мл* раствора фермента прибавляют 0,015 *мл* раствора ДФФ (6) (50-кратный молярный излишек). Сопутствующие протеазы инактивируются. Диализируют против трис-буферного раствора (5). Свободные аминокислоты, которые отщепляются от загрязняющих белков, удаляют этим путем.

Активирование фермента. 0,1—1,5 *мл* диализированного, по большей части от 1 до 3%-ного раствора фермента смешивают с 0,025 *мл* раствора $MnCl_2$ (7) и 0,5 *мл* трис-буферного раствора (8), разводят бидистиллированной водой до 2,5 *мл* и выдерживают в течение 30 мин. при 40° на водяной бане.

Стойкость растворов. Карбоксипептидазу, растворенную в растворе $NaHCO_3$ или в буферном растворе, следует использовать в течение нескольких дней. Раствор в 10%-ном растворе LiCl сохраняется несколько недель.

На холоде и под толуолом лейцинаминопептидаза в буферном растворе 0,005 *М* трис/$MgCl_2$ годами не теряет своей активности. Так как фермент при нейтральной реакции очень неустойчив, рекомендуется иногда проверять значение pH запасного раствора.

Техника. *Материал исследования.* Белки растворяют в 0,001 н. HCl и диализируют 24 часа при 4° против растворителя для удаления адсорбированных аминокислот, пептидов и примесей солей. Диализированный раствор высушивают замораживанием. Для предварительных опытов растворяют определенные количества в фосфатном буферном растворе (3) или в трис-буферном растворе (2), а для основного опыта — в 1%-ном $NaHCO_3$.

Постановка опыта. Ввиду того что скорость ферментативного гидролиза может быть различной у разных субстратов, следует заранее определить оптимальные условия. В предварительных опытах варьируют концентрации субстрата и фермента, температуру реакции и время отбора проб. На небольших количествах вещества определяют освободившиеся аминогруппы нингидрином или посредством серии бумажных хроматограмм, которые дают одновременно также общее представление об отщепленных аминокислотах.

Ферментативный гидролиз. В центрифужную пробирку емкостью 10 *мл* (в водяной бане при 25°) отмеривают пипеткой: 1,0 *мл* пробы (0,2 *мкмоля* белка) [1], 0,5 *мл* раствора фермента (10 или 11), т. е. 60 *мкг* карбоксипептидазы или 300 *мкг* ЛАП, и смешивают.

Пробирку закрывают герметически пробкой. Затем через 5; 10; 30; 60; 120; 300; 420 мин. и т. д. в течение 8 час. в общей сложности берут пробы в количестве 0,1 *мл* для нингидриновой реакции и от 0,01 до 0,03 *мл* пробы для бумажной хроматографии.

Варианты: раствор карбоксипептидазы (10): 0,1—1,0 *мл* (3 *мкг* — 6 *мг* фермента): раствор ЛАП (11): 0,1—1,0 *мл* (20 *мкг* — 60 *мг* фермента); температура: 8—40°; продолжительность реакции: от 4 час. до 3 дней. При продолжительности свыше 12 час. на реакционный

[1] При белке с молекулярным весом в 70 000 — 14 *мг*.

раствор наслаивают 5 *мл* толуола. При объемах растворов в пробирках больше 1,5 *мл* вместо 0,1 *мл* пробы берут по 0,2 *мл*.

Реакция с нингидрином. Для удаления белка смешивают в центрифужной пробирке емкостью 10 *мл* 0,1 *мл* 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты [1]; 0,1 *мл* пробы после ферментативной реакции перемешивают, центрифугируют на холоде, проводят реакцию с нингидрином с 0,1 *мл* надосадочного раствора соответственно стр. 306. Наносят *мкмоли* аминокислот (ордината) против времени взятия проб (асбцисса).

Подготовка к бумажной хроматографии. В маленькую пробирку отмеряют пипеткой: 0,01—0,03 *мл* пробы после ферментативной реакции, 0,05 *мл* 0,1н. HCl (ледяной) или 0,10 *мл* концентрированной муравьиной кислоты (ледяной). Жидкость в пробирке перемешивают и замораживают смесь до проведения бумажной хроматографии (см. «Главный опыт»).

Для бумажной хроматографии можно использовать и надосадочную жидкость, освобожденную от белков посредством трихлоруксусной кислоты. Для этого, однако, необходимо сперва удалить трихлоруксусную кислоту ионитом (например, Амберлит JR4B) [2].

Г л а в н ы й о п ы т. *Ферментативная реакция*: общий объем опыта 1—5 *мл*; 0,5—2 *мкмоля* пробы белка, растворенной в 1%-ном растворе бикарбоната. В остальном — оптимальная температура реакции, количество фермента и время взятия проб (по 0,2 *мл*) — такие же, как и в предварительных опытах: pH 8,0—8,3. При каждом взятии пробы контролируют значение pH опыта (стеклянный электрод) и регулируют его 0,1 н. раствором NaOH из микробюретки.

Приготовление проб для бумажной хроматографии: в пробирки емкостью 20 *мл* с притертыми пробками отмеривают пипеткой: 1) взвесь Дауекс-50 × 8 * (H^+-форма) (25 *мг* ионообменной смолы на 0,1 *мкмоля* аминокислот согласно вычислению по предварительным опытам) и 2) 0,2 *мл* пробы после ферментативной реакции (главный опыт) или 0,1 *мл* пробы после ферментативной реакции (предварительный опыт).

Реакцию пептидазы [3] останавливают добавлением 0,1 н. HCl до pH 3. Пробирки закупоривают и в течение 1 часа механически встряхивают, затем надосадочную жидкость сливают, центрифугируют, надосадочный слой выбрасывают, смолу промывают 4 раза, каждый раз по 5 *мл* воды на 1 *г* смолы; промывную воду выливают. Для элюции аминокислот встряхивают с 4 *мл* 5 н. раствора NH_4OH на 1 *г* смолы в течение 10 мин. Объединенные (после центрифугирования) надосадочные жидкости помещают на ночь в эксикатор над концентрированной серной кислотой и лиофилизуют или полностью высушивают над серной кислотой.

---

[1] Объем, равный объему пробы, следовательно 0,2 *мл* при 0,2 *мл* пробы.

[2] J. H a r r i s. J. Amer. Chem. Soc., 1952, 74, 2944.

* Nalcite HCR или другая подходящая ионообменная смола на основе полистирол-сульфоновой кислоты.

[3] Пептидаза А стрептококков КФ 3.4.4.18.

Бумажная хроматография[1]: восходящая, длина пробега 30—45 *см*. Системы растворителей: а) *н*-бутанол: ледяная уксусная кислота : вода = 4 : 1 : 5; б) вторичный бутанол: муравьиная кислота : вода = 70 : 15 : 5; в) метилэтилкетон: пиридин: вода = 70 : 15 : 15. Для быстрого выбора подходящей системы в предварительном опыте применяют двухмерные хроматограммы. Для полуколичественного определения[2] в наиболее подходящем растворителе хроматографируют 1—15 *мкг* каждой аминокислоты. На лист бумаги наносят в форме точек на расстоянии 2 *см* приготовленные пробы главного и предварительных опытов (диаметр 5 *мм*). С краю наносят опытную смесь известных аминокислот в различных концентрациях (ряд разведений).

Готовые хроматограммы высушивают, опрыскивают реактивом (9) до «шелкового глянца» бумаги[3] и проявляют в сушильном шкафу 6 мин. при 100°.

Оценка. Хроматограмму главного опыта разрезают на полосы и путем субъективного сравнения каждое пятно аминокислоты опыта относят к соответствующей серии разведения известных аминокислот. При такой оценке ошибка составляет 10%. Полоски могут оцениваться и фотометрически. Хроматограммы серий разведения служат тогда в качестве калибровочных величин.

Специфичность метода и предел чувствительности. Карбоксипептидаза: для действия карбоксипептидазы необходимы свободная карбоксильная группа и пептидная связь при аминогруппе (*b*) второй аминокислоты

$$\begin{array}{c} \text{O} \\ \| \\ -\text{C}- \end{array}\underset{(b)}{\text{NH}}-\begin{array}{c} \text{R}' \\ | \\ \text{C} \\ | \\ \text{H} \end{array}-\begin{array}{c} \text{O} \\ \| \\ \text{C} \end{array}-\underset{(a)}{\text{NH}}-\begin{array}{c} \text{R}'' \\ | \\ \text{C} \\ | \\ \text{H} \end{array}-\text{COOH}$$

Остатки R′ и R″ определяют скорость расщепления. Из действия ферментов по отношению к синтетическим пептидам следует, что легче всего отщепляются ароматические аминокислоты, затем аминокислоты с алифатическими R″. Аминокислоты с более длинной цепью отщепляются раньше, чем аминокислоты с более короткой цепью. С-концевая аминокислота с ионогенно более активной боковой цепью (например, аргинин или аспарагиновая кислота) сильно замедляет ферментативную реакцию. Пролин и гидроксипролин совсем не отщепляются. В этих местах пептидной цепи расщепление останавливается. Остаток R′ также оказывает влияние:

[1] Для идентификации продуктов расщепления, особенно при исследовании пептидов, может служить электрофорез при высоком напряжении при pH 6,5; 3,5 и 1,8. Можно присоединить двухмерную бумажную хроматографию.

[2] Концевая карбоксильная группа белка может быть определена количественно после реакции с карбоксипептидазой (pH9; 16 час.) по методу с динитрофторбензолом.

[3] Примешивание коллидина к реактиву для опрыскивания облегчает идентификацию аминокислот благодаря их различному окрашиванию.

остаток пролина или глютамила, расположенный по соседству, замедляет разрыв связи.

Лецинаминопептидаза. Действие фермента было испытано с амидами многих аминокислот. Активность в отношении лейцинамида, который гидролизуется лучше всего, служит критерием (100%). Наряду с лейцином *н*-валин, изолейцин, фенилаланин, триптофан, тирозин, гистидин и валин (84—16%) являются лучшими субстратами. Амиды аминокислоты с заряженными боковыми цепями расщепляются гораздо хуже (7—2%), так же как и амиды аланина и глицина (3 и 0,13%) и пролина и гидроксипролина (0,7 и 0,5%).

Очевидно, аминокислота не образует «точки приложения» фермента при разрушении пептидной цепи. Вообще гидролиз с лейцинаминопептидазой останавливается не так быстро, как гидролиз с карбоксипептидазой; было описано отщепление 24 остатков аминокислот[1].

Относительно других методов расщепления белков см. [2].

Определение глютатиона [3]

П р и н ц и п. При взаимодействии глютатиона с метилглиоксалем в присутствии глиоксалазы (ГЛ-1) восстановленный глютатион (ГВ) переводится количественно в S-лактил-ГВ

$$\text{ГВ} + \text{метилглиоксаль} \rightarrow S\text{-лактил-ГВ}. \quad (1)$$

Окисленный глютатион (ГО) восстанавливается количественно действием восстановленного НАДФ и глютатионредуктазы[2] в ГВ:

$$\text{ГО} + \text{НАДФ-Н} + \text{H}^+ \rightarrow 2\text{ГВ} + \text{НАДФ}. \quad (2)$$

Экстинкцию лактил-ГВ измеряют непосредственно. Убыль НАДФ-H_2 измеряют по изменению экстинкции при 340 или 366 *ммк*. Равновесия обеих реакций лежат с правой стороны. Реакции протекают при данных условиях стехиометрически.

Обе формы глютатиона определяют в одном опыте: сначала определяют ГВ (измерение экстинкции при 240 *ммк*), а затем в той же кювете — ГО (измерение экстинкции при 340 и 366 *ммк*).

Р е а к т и в ы (для того чтобы задержать рост микроорганизмов, сосуды пропаривают): 1) буферный раствор фосфата (0,1 *М* pH 6,8): а) 1,35 *г* KH_2PO_4 растворяют в 100 *мл* бидистиллированной воды; б) 1,75 *г* K_2HPO_4 растворяют в 100 *мл* бидистиллированной воды; 50 *мл* раствора (а) смешивают с 61 *мл* раствора (б), контролируют значение pH (стеклянный электрод); 2) метилглиоксаль (около 0,1 *М*): водный раствор (дистиллят) разбавляют бидистиллированной водой приблизительно в 5 раз, концентрацию контролируют (см. Определение глиоксаля, стр. 382); 3) альбумин (около 1% в/о): 100 *мг* альбумина (из яиц) растворяют в 10 *мл* бидистиллиро-

[1] E. S m i t h. Fed. Proc., 1957, **16**, 801.
[2] КФ 1.6.4.2.

ванной воды и центрифугируют до получения прозрачной надосадочной жидкости или фильтруют от нерастворившегося остатка; 4) бикарбонат натрия (5% в/о): 5 *г* $NaHCO_3$ растворяют в 100 *мл* бидистиллированной воды; 5) восстановленный никотинамидадениндинуклеотид-фосфат (около 0,012 *М* β-НАДФ-H_2): 10 *мг* НАДФ-Н-Na_4 растворяют в 1 *мл* раствора $NaHCO_3$ (4); 6) глиоксалаза-1, ГЛ-1 (1 *мг* белка на 1 *мл*): основную взвесь разбавляют соответственно 3,0 *М* раствором сульфата аммония; 7) глютатионредуктаза (ГР, 1 *мг* белка на 1 *мл*); 8) хлорная кислота (около 6% по весу); 5,2 *мл* 70%-ной хлорной кислоты разбавляют бидистиллированной водой до 100 *мл*; 9) карбонат калия (1,0 *М*): 13,8 *г* обезвоженного K_2CO_3 растворяют в 100 *мл* бидистиллированной воды.

Все растворы и взвеси сохраняются закупоренными в холодильнике (от 0 до 4°) по крайней мере несколько недель. Разведенный раствор метилглиоксаля (2) и раствор НАДФ-H_2 (5) изготовляют заново каждую неделю.

Техника. *Осаждение белков.* Во избежание окисления глютатиона в пробе крови тотчас после взятия осаждают белки. Отмеривают пипеткой в центрифужную пробирку последовательно: 5 *мл* ледяного раствора хлорной кислоты (8) и 5 *мл* крови, хорошо перемешивают тонкой мешалкой и центрифугируют 10 мин. при 3000 *об/мин*. 4 *мл* надосадочной жидкости смешивают с 0,6 *мл* раствора карбоната калия (9), оставляют на 15 мин. в ледяной бане и отфильтровывают от осадка перхлората. Из этого раствора, доведенного буферным раствором до pH около 7, после нагревания до 25° берут 0,5 *мл* для опыта.

Постановка опыта. Измерение ведут при 240 *ммк* — для определения ГВ и при 340 или 366 *ммк* — для ГО; толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости: 2,93 *мл* для ГВ и 3,04 *мл* — для ГО; температура комнатная. Измерение ведут против пустого опыта. Для определения ГВ последовательно отмеривают пипеткой в кюветы: пустой опыт — 2,55 *мл* буферного раствора фосфата (1), 0,50 *мл* пробы, 0,15 *мл* раствора альбумина (3).

Главный опыт. 2,25 *мл* буферного раствора фосфата (1), 0,15 *мл* раствора альбумина (3), 0,50 *мл* пробы, 0,01 *мл* взвеси Гл-1 (6), основательно перемешивают стеклянной или пластмассовой палочкой, уплощенной внизу, измеряют экстинкцию E_1.

Только к главному опыту добавляют 0,02 *мл* раствора метилглиоксаля (2). Измерения экстинкции ведут через 8; 10 и 12 мин. Экстинкцию E_2 определяют экстраполяцией на момент добавления метилглиоксаля. Снова добавляют 0,02 *мл* раствора метилглиоксаля (2), измеряют экстинкцию через 2; 4 и 6 мин. и экстраполируют на время первого добавления метилглиоксаля — E_3.

$$E_3 - E_2 = \Delta E_{\text{метилглиоксаля}}; \quad E_2 - E_1 = \Delta E_{\text{метилглиоксаля}} = \Delta E_{\text{ГВ}};$$

$\Delta E_{\text{ГВ}}$ входит в вычисление.

Для определения ГО в те же кюветы добавляют 0,10 *мл* раствора НАДФ-H_2 (5) и измеряют при 366 *ммк* (или 340 *ммк*) экстинкцию E_4

Только к главному опыту добавляют 0,01 *мл* взвеси ГР (7) и следят за понижением экстинкции. Экстинкцию измеряют через 8; 10 и 12 мин. и определяют E_5 экстраполяцией на время добавления ГР: $E_5 - E_4 = \Delta E_{ГО}$, которая входит в вычисление.

Вычисление ГВ: коэффициент экстинкции S-лактил-ГВ равен $\varepsilon_{240} = 3{,}37$ *см²/мкмоль*. Таким образом, для содержимого кюветы в 2,93 *мл*:

$$\frac{\Delta E_{ГВ} \cdot 2{,}93}{3{,}37} = \textit{мкмолям}\ ГВ\ (\text{главный опыт});\ 1\ \textit{мкмоль}\ ГВ \cdot 307 = \textit{мкг}\ ГВ.$$

Вычисление ГО: коэффициент экстинкции НАДФ-H_2 ε_{340} равен 6,22 *см²/мкмоль* или $\varepsilon_{366} = 3{,}3$ *см²/мкмоль*. Таким образом, для содержимого кюветы в 3,04 *мл* при 340 *ммк*:

$$\frac{\Delta E_{ГО} \cdot 3{,}04}{6{,}22} = \textit{мкмолям}\ ГО\ (\text{главный опыт});$$

при 366 *ммк*:

$$\frac{\Delta E_{ГО} \cdot 3{,}04}{3{,}30} = \textit{мкмолям}\ ГО\ (\text{главный опыт});\ 1\ \textit{мкмоль}\ ГО \cdot 612\ \textit{мкг}\ ГО.$$

Для того чтобы получить содержание глютатиона в миллилитрах исследуемой пробы, следует учитывать разведения, сделанные при осаждении белков и нейтрализации. Кровь содержит около 80% воды (по весу); 1 *мл* крови весит 1,06 *г*. При пробе в 5 *мл* крови, равных 5,30 *г*, осаждение белков дает $5{,}3 \times 0{,}8 + 5 = 9{,}24$ *мл* экстракта. Для нейтрализации на 1 *мл* экстракта используется 0,15 *мл* раствора карбоната калия.

Таким образом, $9{,}24 + 9{,}24 \times 0{,}15 = 10{,}62$ *мл* фильтрата соответствуют 5 *мл* крови.

Для определения брали 0,5 *мл* раствора соответствующих 0,2355 *мл* крови. Для пересчета на содержание глютатиона в 1 *мл* крови умножают на 4,25.

Для ГВ (измерение при 240 *ммк*):

$$\Delta E_{ГВ} \cdot 1133 = \textit{мкг}\ ГВ/\textit{мл}\ \text{крови},$$
$$\Delta E_{ГВ} \cdot 3{,}7 = \textit{мкмолям}\ ГВ/\textit{мл}\ \text{крови}.$$

Для ГО (измерение при 340 *ммк*):

$$\Delta E_{ГО} \cdot 1267 = \textit{мкг}\ ГО/\textit{мл}\ \text{крови}.$$
$$\Delta E_{ГО} \cdot 2{,}07 = \textit{мкмолям}\ ГО/\textit{мл}\ \text{крови}.$$

Для ГО (измерение при 366 *ммк*):

$$\Delta E_{ГО} \cdot 2400 = \textit{мкг}\ ГО/\textit{мл}\ \text{крови},$$
$$\Delta E_{ГО} \cdot 2{,}07 = \textit{мкмолям}\ ГО/\textit{мл}\ \text{крови}.$$

Источники ошибок. Недостаточная чистота реактивов, особенно ферментов, приводит к ложным результатам. Если,

например, глиоксалаза 1 содержит еще глиоксалазу 2, то находят слишком мало ГВ. Если глютатионредуктаза содержит оксидазу НАДФ-H_2, то найденные значения ГО завышены.

Содержащийся в крови ГВ чрезвычайно быстро окисляется в ГО. Если, например, оставляют кровь стоять до осаждения белков около 2 час., то весь глютатион обнаруживается в виде ГО. В растворах, очищенных от белка, ГВ также заметно окисляется. Поэтому для получения точных значений необходима быстрая работа. По необъяснимым до сих пор причинам добавленный в гомогенаты ткани глютатион не обнаруживается там полностью. В присутствии больших количеств иона аспартата или изоглютатиона получают завышенные значения. Точность метода 1,5%.

Определение *L*-аминокислот [1] [3а]

(*L*-лизин, *L*-аргинин, *L*-орнитин, *L*-тирозин, *L*-гистидин, *L*-глютаминовая кислота, *L*-аспарагиновая кислота)

Некоторые бактерии при определенных условиях выращивания производят специфические декарбоксилазы *L*-аминокислот. В большинстве случаев эти декарбоксилазы оптимально эффективны при кислом pH, так что образовавшаяся CO_2 может быть измерена манометрически.

Принцип. Декарбоксилазы аминокислоты катализируют реакции типа

$$R{-}\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}{-}CO_2H \rightarrow R{-}CH_2{-}NH_2 + CO_2$$

Освободившуюся CO_2 измеряют в манометре Варбурга, и она служит мерилом для определения содержания аминокислоты в пробе. Специфические декарбоксилазы могут быть получены для следующих аминокислот: a) *L*-лизин, b) *L*-аргинин, c) *L*-орнитин, d) *L*-тирозин, e) *L*-гистидин, f) *L*-глютаминовая кислота, g) *L*-аспарагиновая кислота.

Для того чтобы получить препараты нужной специфичности, необходимо точно соблюдать условия выращивания культуры и способы получения сухого порошка и применять только приведенные ниже штаммы бактерий.

Реактивы. Растворы, отмеченные буквами от «а» до «d», обозначают реактивы, нужные для определения только семи аминокислот, указанных выше.

Декарбоксилазы аминокислот:

a) *L*-лизиндекарбоксилаза [2]. Ацетоновый ферментный сухой порошок из Bacterium cadaveris (NCJB N 6578). Условия выращивания бактерий и получение сухого порошка см. на

---

[1] Метод можно использовать и для анализа растительного материала.
[2] КФ 4.1.1.18.

стр. 322; b) *L*-аргинин-декарбоксилаза [1]. Ацетоновый сухой порошок из Escherichia coli (NCJB N 7020). Условия выращивания и получение сухого порошка см. на стр. 322; c) *L*-орнитиндекарбоксилаза [2]. Отмытые клетки Clostridium septicum Pasteur (NCJB N 547). Условия выращивания см. на стр. 322; d) *L*-тирозиндекарбоксилаза [3]. Ацетоновый сухой порошок из Streptococcus faecalis (NCJB N 6782). Условия выращивания и получение сухого порошка см. на стр. 322; e) *L*-гистидиндекарбоксилаза [4]. Ацетоновый сухой порошок из Clostridium Welchii BW 21 (NCJB N 6785). Условия выращивания и получение сухого порошка см. на стр. 322; f) декарбоксилаза *L*-глютаминовой кислоты. Отмытые клетки Clostridium Welchii SR 12 [5] (NCJB N 6784). Условия выращивания см. на стр. 322; g) декарбоксилаза *L*-аспарагиновой кислоты. Ацетоновый сухой порошок из Nocardia globerula (NCJB N 8852). Условия выращивания и получение сухого порошка см. на стр. 322.

Препарат декарбоксилазы лизина может содержать следы декарбоксилазы аргинина, которая, однако, исчезает, когда сухой порошок сохраняют в течение двух-трех дней при 0—4 .

Препараты декарбоксилазы гистидина из Cl. Welchii проявляют иногда слабую активность декарбоксилазы глютаминовой кислоты. В этом случае сухой порошок инкубируют в течение ночи в 0,05 *М* боратном буферном растворе (pH 8,5) при 37 (40 *мг* сухого порошка на 1 *мл* буферного раствора), центрифугируют 30 мин. при 4000 *g* и применяют прозрачную желтую надосадочную жидкость в качестве декарбоксилазы гистидина.

Р е а к т и в ы. Буквы от «a» до «g» соответствуют приведенным на стр. 318 семи аминокислотам. Все растворы изготовляют на свежедистиллированной воде.

1. *Буферные растворы*: a) буферный раствор фосфата (0.2 *М*, pH 6,0): 13,0 *мл* 0,2 *М* раствора Na_2HPO_4 (35,6 *г* $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2$ в 1 *л*) смешивают с 87,0 *мл* 0,2 *М* раствора KH_2PO_4 (27,2 *г* KH_2PO_4 в 1 *л*); b) буферный раствор фосфатцитрата, pH 5,2; 46,4 *мл* 0,1 *М* раствора лимонной кислоты (19,2 *г/л*) смешивают с 53,6 *мл* 0,2*М* раствора Na_2HPO_4 (35,6 *г* $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$/*л*); c, d) буферный раствор фосфат цитрата, pH 5,5: 43,1 *мл* 0,1 *М* раствора лимонной кислоты (19,2 *г/л*) смешивают с 65,9 *мл* 0,2*М* раствора Na_2HPO_4 (35,6 *г* $Na_2HPO_4 \cdot$ $\cdot 2H_2O$/*л*); e, f) буферный раствор ацетата, 0,2 *М*, pH 4,5: 42,5 *мл* 0,2 *М* раствора ацетата натрия (16,4 *г/л*) смешивают с 57,5 *мл* 0,2 *М* уксусной кислоты (12,0 *г* ледяной уксусной кислоты в 1 *мл*); g) буферный раствор ацетата, 0,1 *М*, pH 5,5: 88,0 *мл* 0,1 *М* раствора ацетата Na (8,2 *г/л*) смешивают с 12,0 *мл* 0,1 *М* уксусной кислоты (6,0 *г* ледяной уксусной кислоты в 1 *л*).

---

[1] КФ 4.1.1.19.
[2] КФ 4.1.1.17.
[3] КФ 4.1.1.25.
[4] КФ 4.1.1.22.
[5] Применяют только этот штамм.

2. *Взвеси фермента*: a) декарбоксилаза *L*-лизина: 100 *мг* сухого ацетонового порошка суспендируют в 5 *мл* буферного раствора (1a); b) декарбоксилаза *L*-аргинина: 100 *мг* сухого ацетонового порошка суспендируют в 5 *мл* буферного раствора (1в); c) декарбоксилаза *L*-орнитина: 250 *мг* отмытых клеток суспендируют в 5 *мл* буферного раствора (1 c, d); d) декарбоксилаза *L*-тирозина: 100 *мг* сухого ацетонового порошка суспендируют в 5 *мл* буферного раствора (1 c, d); e) декарбоксилаза *L*-гистидина: 300 *мг* сухого ацетонового порошка суспендируют в 5 *мл* буферного раствора (1 e, f); f) декарбоксилаза *L*-глютаминовой кислоты: 200 *мг* отмытых клеток суспендируют в 5 *мл* буферного раствора (1e, f); d) декарбоксилаза *L*-аспарагиновой кислоты: 50 *мг* сухого ацетонового порошка суспендируют в 5 *мл* буферного раствора (1 g).

Буферные растворы сохраняются при 0—4° в закупоренных бутылях неограниченное время. Стабильность сухого ацетонового порошка меняется от препарата к препарату. Обычно они сохраняют активность в течение 2—3 месяцев (иногда годами) при хранении в эксикаторе. Иногда же препараты теряют активность в течение нескольких дней. Взвеси Cl. Welchii SR 12 сохраняются при 4° несколько недель. Активность декарбоксилазы орнитина взвесей Cl. septicum может утратиться при 4° в течение 2—3 дней. Лучше всего применять для каждого определения свежеизготовленную взвесь.

Техника. *Подготовка исследуемого материала.* Исследуемый раствор аминокислоты не должен содержать ингибирующих веществ для препарата соответствующей декарбоксилазы. Его pH должен соответствовать оптимальному pH фермента или должно быть возможно установить его на этом значении посредством буферного раствора. Углеводы не подвергаются действию препаратов декарбоксилазы. Если исследуемый материал содержит способные сбраживаться сахара, например глюкозу, то рекомендуется (прежде всего при применении взвесей клеток в качестве препаратов декарбоксилазы) поставить контрольный опыт с одинаковыми концентрациями сахара.

Постановка опыта. Манометрический прибор Варбурга, сосуды с боковой камерой. Температура во время измерения 37° (постоянная); газовая фаза — воздух.

Для каждого определения требуются 3—4 сосуда: 1—2 для опыта, 1 — сравнительный (без субстрата), 1 термобарометр.

Сосуды наполняют следующим образом (в *мл*):

		Опытный	Сравнительный	Термобарометр
Главная камера	Проба	0,5 –1,0	—	—
	Дистиллированная вода	—	0,5—1,0	2,5
	Буферный раствор . .	1,5—1,0	1,5—1,0	—
Боковые камеры	Препарат фермента .	0,5	0,5	—

Содержимое сосудов выдерживают при постоянной температуре (37°) 5—10 мин. Регистрируют показания уровня манометра, закрывают краны, препарат фермента выливают в главную камеру, следят за показаниями уровня манометра, после прекращения реакции (10—30 мин.) отмечают конечные значения.

При определении лизина, орнитина и аспарагиновой кислоты в конце реакции pH оказывается > 5,8. Таким образом, задерживается выделение CO_2. Применяют сосуды манометра с двумя боковыми камерами. Во вторую боковую камеру помещают 0,4 *мл* 2 н. H_2SO_4, после прекращения реакции кислоту опрокидывают в главную камеру, регистрируют конечное значение уровня манометра.

Вычисление. Образовавшийся объем CO_2 вычисляют по уровням манометра, исправленным в соответствии с показанием термобарометра (*мм* столба жидкости) посредством умножения на константу сосуда *K*.

$$K = \frac{V_g \frac{273}{T} + V_F \alpha}{P_0},$$

где V_g— объем газовой фазы в манометре (*мкл*), V_F— объем жидкости в манометре (*мкл*), α — растворимость CO_2 в воде при 760 *мм* Hg и *T* (*мл*), *T*—температура реакции (°K), P_0— высота столба жидкости, соответствующая 760 *мм* ртути (обычно P_0 = 10 000 *мм*).

Обычно не освобождаются 100% теоретически вычисленной двуокиси углерода. Определения на стандартных препаратах дали следующие результаты (последний столбец — фактор, на который следует умножить полученный объем CO_2, для определения аминокислот в *мг*):

100 *мкл* CO_2 образуются от:	Выход, %	Фактор
a) 0,652 *мг* лизина	98	$\frac{0,652}{98}$
b) 0,775 *мг* аргинина	95	$\frac{0,775}{95}$
c) 0,590 *мг* орнитина	98	$\frac{0,590}{98}$
d) 0,810 *мг* тирозина	96	$\frac{0,810}{96}$
e) 0,692 *мг* гистидина	96	$\frac{0,692}{96}$
f) 0,656 *мг* глютаминовой кислоты	98	$\frac{0,656}{88}$
g) 0,596 *мг* аспарагиновой кислоты	97	$\frac{0,596}{97}$

Пример. Протокол опыта определения лизина (уровни манометра, исправленные соответственно значению термобарометра):

Показатель	Для сравнения	Опытная смесь
Повышение давления при ферментативной реакции, *мм* рт. ст.	2	154
Повышение давления после вливания серной кислоты, *мм* рт. ст.	13	25
Совокупное повышение давления, *мм* рт. ст.	15	179
Константа сосуда	1,73	1,89
Совокупный объем CO_2, *мкл* . .	15·1,73=26	179·1,88=338
CO_2 из лизина, *мкл*.	—	338—26=312

$$312 \cdot \frac{0,652}{98} = 2,08 \text{ мг лизина/опытная смесь.}$$

Специфичность метода. Каждый препарат фермента специфичен для своей *L*-аминокислоты. Карбоксильная группа и *L*-аминогруппа не должны быть замещены. Иногда вступают в реакцию и дериваты аминокислоты с группой OH в остатке молекулы: декарбоксилаза лизина (см. стр. 320) медленно реагирует с гидроксилизином из желатина.

От 5 до 10% фенилаланина подвергаются воздействию декарбоксилазы тирозина (см. стр. 320) так же быстро, как и тирозин; фермент реагирует также и с *L*-3,4-дегидроксифенилаланином. Декарбоксилаза глютаминовой кислоты освобождает CO_2 из некоторых изомеров β-гидроксиглютаминовой кислоты и из *L*-аспарагиновой кислоты, поскольку смесь содержит пируват, α-кетоглютарат или другие кетокислоты. Декарбоксилирование *L*-аспарагиновой кислоты ингибируется добавлением 0,25% (в/о) ацетилтриметил бромида аммония.

Получение ферментных препаратов. Для успешного проведения определения решающим является точное выполнение приведенных в литературе условий выращивания. Для первой ориентации служат следующие указания: буквы от «а» до «g» соответствуют вышеприведенным на стр. 318.

Условия выращивания (культуры): a, b) 30 час. при 25°, в среде, содержащей 3% казеинового гидролизата и 2% глюкозы; c, e, f) 16 час. при 37° в среде, содержащей 3% казеинового гидролизата, 2% глюкозы, 0,1% экстракта дрожжей и кусков ткани сердечной мышцы. Анаэробные условия; g) 16 час. при 37° в среде, содержащей 3% казеинового гидролизата, 2% глюкозы и 0,1% экстракта дрожжей; i) 60 час. при 30° в 2%-ном пептоне. Аэробные условия. При «а», «b» и «d» бактерии выращивают в колбе, наполненной до горлышка и незакупоренной. Тогда условия роста частично анаэробные.

Изготовление сухого ацетонового порошка. Клетки суспендируют в дистиллированной воде до получения густой взвеси или крема. При помешивании эту взвесь быстро вливают в пятикратный объем холодного ацетона и продолжают перемешивать до полного коагулирования. Осадок отсасывают (воронки Бюхнера), промывают на воронке ацетоном и эфиром по одному разу и высушивают на воздухе [1].

Мальмстадт и Гадинаноу предлагают [4] автоматический спектрофотометрический кинетический метод для специфического ферментативного определения некоторых α-аминокислот: α-*L*-аминокислоты окисляются в присутствии оксидазы α-*L*-аминокислот с образованием перекиси водорода. При достаточном избытке остальных реактивов скорость реакции прямо пропорциональна концентрации α-*L*-аминокислот.

Образовавшаяся перекись водорода в присутствии пероксидазы хрена немедленно реагирует с *о*-дианизидином с образованием окрашенного вещества с максимумом поглощения при 440 *ммк*. В ранее описанной установке [4] автоматически определяют время, необходимое для заданного изменения экстинкции. Оно обратно пропорционально концентрации α-*L*-аминокислот. Концентрацию оксидазы α-*L*-аминокислот подбирали так, чтобы время реакции составляло от 15—20 сек. до 2 мин. Определяют 20—200 *мкг* α-*L*-аминокислот, ошибка определения 2%. Возможно определение следующих α-*L*-аминокислот: изолейцина, α-аминомасляной кислоты, цитрулина, лейцина, метионина, норлейцина, норвалина, фенилаланина, триптофана, гистидина и тирозина. Для двух последних α-*L*-аминокислот скорость реакции уменьшается в присутствии *D*-форм.

Аланин, аргинин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты, пролин, серин, треонин и валин не окисляются оксидазой α-*L*-аминокислот. Определению мешают бензойная, миндальная, салициловая и йодуксусная кислоты, ароматические сульфокислоты и алифатические α-аминосульфокислоты [4].

Определение *D*-аминокислот [2] [5]

При окислительном дезаминировании α-аминокислот одновременно с образованием аммиака и использованием кислорода образуются α-кетокислоты. Почечная ткань содержит фермент, который специфически дезаминирует *D*-аминокислоты. Оксидаза *D*-аминокислоты содержит в качестве кофермента флавинадениндинуклеотид (ФАД). Гринштейн применял этот фермент для того, чтобы из рацематов аминокислот получить чистые *L*-формы [3].

В таблице показана активность препарата оксидазы *D*-аминокислоты из овечьей почки в отношении *D*-аминокислот. Можно

---

[1] Детали выращивания всех упомянутых культур см. E. Gale в книге D. Glick. Methods of Biochemical Analysis, Interscience. N. Y., 1957, 4, 285, а также L. Crawford. Bioch. J., 1958, 68, 221.

[2] КФ 1.4.3.3. Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

[3] J. Greenstein. Advances Protein Chem., 1957, 9, 121.

дезаминировать ферментом из свиной почки также и *D*-аспарагиновую и *D*-глютаминовую кислоты, если повышать концентрацию фермента и удлинять время реакции [5].

Оксидаза *D*-аминокислот встречается в почках и печени всех млекопитающих и других позвоночных животных, больше всего в почках овец и свиней. Фермент из гепато-панкреаса активен в отношении *D*-аспарагиновой кислоты и *D*-глютаминовой кислоты. Препараты оксидазы *D*-аминокислоты из Neurospora crassa, Aspergillus niger, Proteus morganii и др. значительно менее активны, чем препараты из свиной и овечьей почки [5].

Скорость окисления *D*-аминокислот оксидазой *D*-аминокислоты из овечьей почки [5]

D-аминокислота	*мкл* O_2 в час на 1 *мг* сухого веса препарата фермента	*D*-аминокислота	*мкл* O_2 в час на 1 *мг* сухого веса препарата фермента
Аланин	64	Тирозин	190
α-аминомасляная кислота	31	Гистидин	6,2
α-аминовалериановая кислота	20	Лизин	0,6
α-аминокапроновая кислота	36	Триптофан	37
Валин	35	Орнитин	3,1
Лейцин	14	Серин	42
Изолейцин	22	Треонин	2,1
Аспарагиновая кислота	1,4	Пролин	148
Глютаминовая кислота	0	Пипеколиновая кислота	2,6
α-аминоадипиновая кислота	0	Метионин	80
Фенилаланин	26	Цистин	1,9

Манометрическое измерение

Принцип. Оксидаза *D*-аминокислоты катализирует реакцию:

$$2R-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH + O_2 \rightarrow 2R-\underset{\displaystyle NH}{\underset{\|}{C}}-COOH + H_2O_2 \qquad (1)$$

Иминокислота разлагается спонтанно:

$$R-\underset{\displaystyle NH}{\underset{\|}{C}}-COOH + H_2O \rightarrow R-\underset{\displaystyle O}{\underset{\|}{C}}-COOH + NH_3. \qquad (2)$$

Если каталазой разрушают перекись водорода, образующуюся в реакции (1), то общая реакция имеет вид:

$$R-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH + {}^1/{}_2O_2 \rightarrow R-\underset{\displaystyle O}{\underset{\|}{C}}-COOH + NH_3. \qquad (3)$$

1 *моль* D-аминокислоты дает 1 *моль* α-кетокислоты и 1 *моль* аммиака и использует 0,5 *моля* кислорода. Этот расход кислорода измеряют. Он является мерой суммы содержащихся в пробе аминокислот, кроме D-аминоадипиновой кислоты (а также глютаминовой кислоты и лизина, которые большей частью превращаются не полностью).

Сырой препарат оксидазы D-аминокислоты, полученный из почки овец и свиней (стр. 328), отвечает требованиям анализа, так же как и имеющийся в продаже лиофилизированный препарат каталазы.

Реактивы: 1) пирофосфатный буферный раствор (0,1 *M*, pH 8,3): 8,922 *г* $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$ растворяют в 100 *мл* бидистиллированной воды, добавляют 8 *мл* 1 н. HCl, доливают бидистиллированной водой до 200 *мл*; 2) D-аланин (10 *мкмоль/мл*): 89,1 *мг* D-аланина растворяют в 100 *мл* бидистиллированной воды; 3) оксидаза D-аминокислоты: сырой раствор фермента непосредственно применяют согласно стр. 329; 4) каталаза в виде порошка. Получение см. J. Sumner a. A. Daunce в кн. Colowick S. a. Kaplan N., Methods in Enzymologie, Acad. Press, N. Y., 1955, II, p. 775; 5) 2 н. раствор KOH; 6) 10%-ный (в/об) раствор вольфрамата натрия; 7) 0,66 н. серная кислота; 8) насыщенный раствор 2,4-динитрофенилгидразина в 2 н. HCl; 9) 10% (в/об) карбоната натрия; 10) 10%-ный (об/об) раствор серной кислоты; 11) эфир этиловый; 12) 96%-ный этанол.

Техника[1]. *Подготовка материала.* Для манометрического определения требуются по меньшей мере 10 *мкмолей* D-аминокислоты, находящихся в 2 *мл* раствора (pH 8,3). Из кислого гидролизата белка удаляют соляную кислоту (для этого при нагревании через раствор продувают воздух; лучше перенести раствор на катионит и элюировать разведенным раствором аммиака[2]. Элюат концентрируют при низкой температуре, лучше всего лиофилизировать, чтобы предотвратить рацемизацию аминокислот. Весь аммиак должен быть удален, так как он может мешать определению аммиака, освобождающегося при дезаминировании. Растворы, содержащие D-аминокислоты (например, биологические жидкости — такие, как плазма или сыворотка крови, ферментативные смеси), применяют без предварительной обработки, если они содержат достаточно D-аминокислот, не характеризуются сами слишком большим потреблением кислорода и содержат не слишком много аммиака или α-кетокислот. В противном случае их очищают от белка, изолируют свободные аминокислоты посредством хроматографии на катионите или концентрируют.

Постановка опыта. Измерение проводят в аппарате Варбурга. Конические сосуды с грушевидной насадкой и камерой. Температура

---

[1] Предварительная обработка пробы должна проводиться в точном соответствии с ее составом. Целесообразно определять для подкрепления результатов опыта также и образование аммиака и количество образованных α-кетокислот в продуктах реакции.

[2] P. Boulanger et al. Bull. Soc. Chim. Biol. France, 1952, 34, 366.

измерения 37°, газовая фаза — кислород, объем измеряемой жидкости 3,0 *мл*.

Для одного определения требуется 5 сосудов: 1) термобарометр; 2) слепой опыт для определения потребления O_2 растворами сырого фермента оксидазы *D*-аминокислоты (отпадает при применении очищенного фермента); 3) функциональная проба. 20 *мкмолей* *D*-аланина должны претерпеть окислительное дезаминирование приблизительно за 20 мин. с использованием 224 *мм*^{3} кислорода; 4) контрольный опыт для определения потребления O_2 самой пробой не всегда нужен; однако раствор постоянно служит для определения аммиака в пробе до воздействия фермента; 5) основной опыт.

В сосуды отмеривают пипеткой:

Главная камера	Номера сосудов				
	1	2	3	4	5
Пирофосфатный буферный раствор (1), *мл*	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
Каталаза (4), *мг*	—	0,5	0,5	0,5	0,5
Раствор *D*-аланина (2), *мл*	—	—	2,00	—	—
Проба, *мл*	—	—	—	2,00	2,00
Вода, *мл*	2,25	2,00	—	—	—
Пустой опыт (сосуд с водой)	—	—	—	0,25	—
Оксидаза *D*-аминокислоты (3), *мл*	—	0,25	0,25	—	0,25
Вставка 2 н. KOH (5) (на фильтровальной бумаге), *мл*	0,2	0,20	0,20	0,20	0,20

Через сосуды в течение 2 мин. пропускают кислород, поддерживают равномерную температуру 5—10 мин., закрывают краны манометра, регистрируют показания уровня манометра; затем содержимое сосуда с грушевидной насадкой опрокидывают в главную камеру и каждые 5 минут регистрируют показания манометра, пока потребление кислорода во всех сосудах практически не становится равным нулю. Скорость реакции колеблется в широких границах в зависимости от вида аминокислоты и состава испытуемого раствора, продолжительность реакции большей частью гораздо больше 20 мин., требуемых для аланина. Содержимое сосудов можно использовать для определения аммиака и α-кетокислот.

Вычисление. Изменения показаний манометра поправляют на показания термобарометра (сосуд 1), помножают на константы сосудов и получают *мкл* потребленного кислорода. Значение, полученное для сосуда 2 (количество потребленного кислорода самим препаратом фермента), вычитают из значений для сосудов 3—5. Потребление O_2 в сосуде 3 должно быть теперь равным 224 *мкл* (соответственно 20 *мк молей* аланина). Значение для сосуда 4 представляет потребление кислорода пробой. На это значение умень-

шают величину потребления O_2 в сосуде 5 и получают количество потребленного кислорода в результате окислительного дезаминирования *D*-аминокислот пробы. Так как 1 *мкмоль* *D*-аминокислот соответствует $^1/_2$ *мкмоля* O_2=11,2 *мкл*, то содержание *D*-аминокислоты в 1 *мл* пробы: *мкмоли* *D*-аминокислот/*мл*=*мкл* кислорода/11,2 ·объем пробы в опыте.

Определение аммиака, выделяемого в свободном виде. Пипеткой с длинновытянутым концом из главной камеры каждого сосуда Варбурга берут 1,5 *мл* раствора и смешивают в конических центрифужных пробирках емкостью 10 *мл* с 1 *мл* 50%-ного (в о) раствора трихлоруксусной кислоты и 2,5 *мл* воды. 15 мин. центрифугируют при 3000 *об/мин*; надосадочные жидкости используют для определения аммиака по Конвею. Содержимое сосуда 4 служит в качестве контроля (содержание NH_3 до ферментативной реакции), содержимое сосуда 1 служит в качестве слепого (пустого) опыта реактивов.

Идентификация полученных α-кетокислот. Полученные кетокислоты могут быть идентифицированы посредством хроматографирования на бумаге из 2,4-динитрофенилгидразонов. Можно подойти к первоначальным аминокислотам и путем гидролиза этих гидразонов идентифицировать эти аминокислоты хроматографически на бумаге. У обоих методов один и тот же недостаток: они неприменимы к динитрофенилгидразонам α-кетокислот, которые получаются при дезаминировании основных *D*-аминокислот (диаминомасляная кислота, орнитин, лизин, аргинин, гистидин), так как эти гидразоны не могут быть экстрагированы эфиром из кислого раствора.

Из камеры каждого сосуда манометра осторожно удаляют пропитанную КОН фильтровальную бумагу; содержимое сосуда количественно переносят в калиброванные центрифужные пробирки емкостью 10 *мл*, вливают в каждую пробирку 1 *мл* 10%-ного (в о) раствора вольфрамата натрия (6) и 1 *мл* 0,66 н. H_2SO_4 (7), доливают водой до метки, центрифугируют и сливают надосадочную жидкость в маленькие делительные воронки емкостью 50 *мл*. Добавляют по 2 *мл* насыщенного раствора 2,4 — динитрофенилгидразина в 2 н. HCl (8). Отстаивают 1—2 часа и извлекают гидразоны путем многократного встряхивания со свободным от перекиси эфиром. Объединенные эфирные растворы промывают небольшим количеством воды и экстрагируют небольшими количествами 10%-ного (в о) раствора карбоната натрия до полного удаления гидразонов. Водные растворы карбоната осторожно подкисляют 10%-ной серной кислотой (10) и гидразоны снова экстрагируют небольшим количеством эфира. Эфирные растворы соединяют, эфиру дают испариться в небольших чашках в темноте. Остатки растворяют в 0,5 *мл* этанола и употребляют эти растворы для идентификации α-кетокислот посредством бумажной хроматографии или для гидролиза.

Если содержание в пробе D-аминокислот слишком мало для манометрического метода, то можно вести измерение по одному из следующих ферментативных методов.

Бумажная хроматография

Принцип. Аминокислоты разделяются по известным методам посредством двухмерной бумажной хроматографии, хроматограмму опрыскивают раствором очищенной оксидазы D-аминокислоты и каталазой. Образующиеся α-кетокислоты после опрыскивания реактивом Виланда становятся видны в УФ-лучах (желтая флуоресценция).

Реактивы и растворы. Все растворы, необходимые для бумажной хроматографии, и кроме того: 1) смесь оксидаза D-аминокислоты/каталаза: 2 *мл* раствора оксидазы D-аминокислоты (раствор 3, стр. 325) + 5 *мл* порошка каталазы растворяют в воде, объем доводят до 100 *мл* бидистиллированной водой; 2) реактив Виланда: 100 *мл* *о*-фенилендиамина растворяют в 100 *мл* 5%-ного раствора (в/о) трихлоруксусной кислоты.

Техника. Двухмерную бумажную хроматограмму пробы опрыскивают раствором оксидазы D-аминокислоты/каталазы (1), держат 1—2 часа в закрытом сосуде в атмосфере водяного пара при комнатной температуре. Опрыскивают реактивом Виланда. Грязновато-желтую флуоресценцию в ультрафиолетовых лучах или розовое окрашивание после нагревания Е сравнивают со стандартной хроматограммой [5].

Помехи и чувствительность: раствор оксидазы D-аминокислоты также легко флуоресцирует. Благодаря этому реакция сильно теряет в своей чувствительности.

Ионообменная хроматография

Принцип. Половину проб инкубируют с высокоактивной оксидазой D-аминокислоты (без добавления каталазы) около 3 час. при 37,5°. Предварительно обработанные и необработанные пробы обнаруживают при ионообменной хроматографии различное содержание аминокислоты. Разница соответствует содержанию D-аминокислоты в пробах.

Приложение. *Изолирование оксидазы D-аминокислоты*[1]. Сырой экстракт из свиной почки обладает более высокой активностью в отношении D-аспарагиновой кислоты и D-глютаминовой кислоты, однако он менее стабилен, чем фермент из овечьей почки. Он легко диссоциируется на ФАД и неактивный белок. Для изготовления сырого фермента применяют свиную почку, для изготовления чистого препарата — овечью.

[1] КФ 1.4.3.3.

Необходимые растворы: 1a) пирофосфатный буферный раствор (0,05 *М*, pH 8,3): раствор (1), стр. 325, разводят водой в отношении 1 : 1; 1b) пирофосфатный буферный раствор (0,017 *М*, pH 8,3): раствор 1a разводят водой в отношении 1 : 2; 1c) пирофосфатный буферный раствор (0,067 *М*, pH 8,3): раствор 1, стр. 325, разводят водой в отношении 2 : 1.

Техника (детали см. сноску[1]).

Ацетоновый ферментный сухой порошок. Почки свежезаколотых свиней или овец (а также замороженные почки, если их перерабатывают немедленно после оттаивания) освобождают от оболочки, обезжиривают, разрезают на мелкие кусочки и гомогенизируют с трехкратным объемом ацетона при +4°. Взвесь тотчас отсасывают на фильтре. Влажный остаток суспендируют в равном объеме холодного ацетона и фильтруют. Еще раз промывают ацетоном и 3 раза тем же объемом эфира при +4°.

Изготовление сырого фермента. 1 *г* сухого порошка ацетона в течение 20 мин. смешивают с 4 *мл* пирофосфатного буферного раствора (1a). Центрифугируют 30—40 мин. при 3000 *об/мин*, удаляют тонкий слой жира, сливают сильно окрашенную надосадочную жидкость, если нужно, фильтруют. Этот сырой экстракт применяют для манометрических определений.

Приготовление очищенного фермента. Работу проводят по Негелейну и Брёмелю, только вместо сульфата аммония применяют сульфат натрия для фракционного осаждения, чтобы в реакционной исходной смеси можно было определить освободившийся аммиак.

10 *г* сухого порошка из овечьей почки суспендируют в 250 *мл* 0,017 *М* буферного раствора пирофосфата (1в) и помешивают 45 мин. при 38°, затем центрифугируют 30 мин. при 3000 *об/мин*. Надосадочную жидкость сливают, устанавливают pH 5,1, наконец, быстро доводят температуру до 38° и охлаждают в ледяной воде до 15°. Смесь тотчас центрифугируют, надосадочную жидкость фильтруют. К каждым 100 *мл* фильтрата добавляют 17 *г* свободного от воды сульфата натрия и помешивают в течение 2 час. при комнатной температуре. Осадок отделяют центрифугированием и помещают в 10 *мл* 0,067 *М* пирофосфатного буферного раствора (1c). Этот раствор фермента применяют для определения. Очищенный фермент не проявляет дезаминирующей активности по отношению к α-аминокислотам и глицину.

Определение *L*-аланина [6]

Принцип. *L*-аланин в присутствии кетоглютарата превращается глютамат-пируват-трансаминазой (ГПТ) в пируват.

$$\alpha\text{-кетоглютарат} + L\text{-аланин} \overset{\text{ГПТ}}{\rightleftarrows} L\text{-кетоглютамат} + \text{пируват} \qquad (1)$$

---

[1] E. Negelein u. H. Brömel. Bioch. Z., 1939, 300, 225.

Лактатдегидрогеназа [1] (ЛДГ) восстанавливает пируват в присутствии восстановленного НАД в молочную кислоту.

$$\text{Пируват} + \text{НАД-Н} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{ЛДГ}} L\text{-лактат} + \text{НАД}^+ \qquad (2)$$

За уменьшением НАД-H_2 следят, снимая отсчеты со спектрофотометра при 340 или 366 *ммк*. Реакция с ферментом-индикатором протекает полностью слева направо, так как константа равновесия при pH 7 и 25° составляет $7 \cdot 10^4$ 1/*моль*. Однако определение конечного значения невозможно, так как константа Михаэлиса фермента слишком велика для аланина. При избытке обоих ферментов и НАД-H_2 скорость сопряженной реакции для ограниченных концентраций аланина строго пропорциональна исследуемому количеству аланина.

Измеряя скорость реакции при помощи калибровочной кривой, построенной по известным концентрациям аланина, можно проводить определения аланина в исследуемой пробе.

Оба фермента должны быть по возможности свободны от глютаматдегидрогеназы, так как иначе, вследствие высокой концентрации α-кетоглютарата, было бы израсходовано очень много НАД-H_2. Продажная ЛДГ отвечает этому требованию. Получаемый из свиных сердец препарат ГПТ обладает достаточной активностью для этого метода определения.

Реактивы: 1) фосфатный буфер (15 *М*, pH 7,2): а) 11,876 *г* $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ растворяют в бидистиллированной воде, объем доводят до 1000 *мл*; б) 9,078 *г* KH_2PO_4 растворяют в бидистиллированной воде, объем доводят до 1000 *мл*; растворы *а* и *б* смешивают в отношении 72 : 28; 2) α-кетоглютарат (0,1 *М*): 1,46 *г* α-кетоглютаровой кислоты растворяют приблизительно в 50 *мл* бидистиллированной воды, нейтрализуют 2 н. раствором едкого натрия и доливают водой до 100 *мл*; 3) восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (около $1,2 \cdot 10^{-2}$ *М* НАД-H_2): 50 *мг* НАД-Н-Na_2 растворяют в 5 *мл* бидистиллированной воды; 4) стандартный раствор аланина (2 *мг/мл*); 20 *мг* *L*-аланина растворяют в 10 *мл* бидистиллированной воды, 5) лактатдегидрогеназа, ЛДГ (около 1 *мг* белка на 1 *мл*): кристаллическую взвесь разводят соответственно 2,2 *М* раствором сульфата аммония; 6) глютаматпируваттрансаминаза, ГПТ (около 10 *мг* белка на 1 *мл*): препараты, приготовленные по методу Граина и Пфлейдерера[2], применяют неразведенными. Продажные препараты соответственно разводят 1 *М* раствором сульфата аммония.

Растворы низкомолекулярных веществ, хорошо закупоренные, можно сохранять в холодильнике или замороженными (камера глубокого охлаждения) около 14 дней, однако рекомендуется до начала большой серии измерений изготовлять стандартный раствор

---

[1] КФ 1.1.1.27.
[2] L. Greina. G. Pfleiderer. Bioch. Z., 1958, 330, 433.

аланина свежим. Взвесь ЛДГ сохраняется несколько месяцев без значительной потери активности, взвесь ГПТ — в течение 6—8 недель при 0—4°. Более высоких концентраций сульфата аммония следует здесь избегать, так как иначе при стоянии постепенно отщепляется пиридоксальфосфат, простетическая группа фермента, и фермент становится необратимо инактивированным.

Т е х н и к а. *Подготовка исследуемого материала.* Экстракты ткани очищают от белка 3-минутным нагреванием в кипящей водяной бане, осажденный белок отделяют центрифугированием. При очень небольшом содержании (ниже 50 *мкг*) аланина в пробе надосадочную жидкость высушивают замораживанием и сконцентрированную снова растворяют.

Гидролизаты белка (полученные при 15—72-часовом нагревании с разбавленной соляной кислотой (1 : 1) при 110°) освобождают от избыточной соляной кислоты в вакууме на водяной бане или в вакуумэксикаторе над концентрированной серной кислотой и едким кали. Остаток разводят в небольшом количестве воды. Повторяют процесс выпаривания. Остаток растворяют в воде, нейтрализуют 2 н. раствором едкого натра и доливают до определенного объема.

Калибровочная кривая. Для каждой серии измерений следует построить калибровочную кривую. Из стандартного раствора *L*-аланина (4) добавляют к опыту от 0,04 до 0,20 *мл* (соответствует 80—400 *мкг* *L*-аланина) и измеряют экстинцию, как описано ниже. По полученным данным строят калибровочную кривую, откладывая по ординате поправленные в случае необходимости скорости $\Delta E/мин$, а по абсциссе — *мкг* *L*-аланина. Калибровочная кривая должна пройти через нулевую точку системы координат[1].

Постановка опыта. Измерение ведут при 340 или 336 *ммк*, толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 4,0 *мл*. Температура комнатная, постоянная в пределах одной серии измерений. Проводят двойные определения с различными количествами пробы.

Последовательно отмеривают пипеткой в кюветы: 0,20 *мл* раствора α-кетоглютарата (2); 0,10 или 0,20 *мл* стандартного раствора аланина (4) или предварительно обработанной пробы; 0,06 *мл* раствора НАД-H_2 (3), 0,01 *мл* взвеси ЛДГ (5), буферный раствор (1) — до 3,96 *мл*; смесь перемешивают и несколько минут наблюдают за незначительным движением экстинкции ($\Delta E_1/мин$).

Смешивая с 0,04 *мл* взвеси ГПТ (6), начинают проведение трансаминазной реакции. На протяжении приблизительно 5 мин. измеряют понижение экстинкции каждые 60 сек. ($\Delta E_2/мин$).

Вычисление. Реакция трансаминазы протекает с относительно линейной скоростью, поэтому могут быть определены значения скорости. $\Delta E/мин = \Delta E_2/мин - \Delta E_1/мин$ является поправленной скоростью трансаминазной реакции. Эти значения служат для вычер-

[1] Относительно поправки к калибровочной кривой см. стр. 336.

чивания калибровочной кривой в тех случаях, когда были введены известные количества аланина и для определения концентрации аланина в неизвестных пробах по калибровочной кривой.

Источники ошибок. Благодаря конкурирующему окислению НАД-H_2 посторонними веществами слепой опыт дает несколько завышенные результаты. Но это повышение может быть обнаружено только потому, что прямая, проведенная на основании значений калибровочной кривой, не проходит через нулевую точку системы координат. В таких случаях проводят параллельную прямую через нулевую точку и, таким образом, получают правильную калибровочную кривую.

При анализе гидролизатов белка с очень незначительным содержанием аланина может случиться, что другие аминокислоты, вследствие значительного избытка, ингибируют конкурирующим образом реакцию с трансаминазой. Это ингибирование можно учесть таким образом: при измерении калибровочных значений, кроме стандартного раствора аланина, вносят постоянное количество раствора пробы в опытную смесь и относят найденное увеличение скорости реакции на счет добавленного количества аланина.

В описанных здесь условиях речь идет только об *L*-аланине, но не о *D*-форме этой аминокислоты. Другие аминокислоты не превращаются и в умеренном избытке не действуют ингибирующим образом. α-аминомасляная кислота, которая реагирует с ГПТ, даже при большом избытке не вызывает убыли дополнительно добавленного НАД-H_2. Точность метода 1,5%. Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

Определение *D,L*-треонина [7]

Принцип. Иодат окисляет треонин при нейтральном значении pH в ацетальдегид и глиоксалат, который в течение нескольких минут окисляется дальше в формиат и CO_2. После разрушения избыточного иодата меркаптаном, ацетальдегид определяют алкогольдегидрогеназой (АДГ) и восстановленным НАД (НАД-H_2). Мерой измерения служит уменьшение экстинкции НАД-H_2 при 340 *ммк*. Из всех способов определения треонина, при которых ацетальдегид должен быть удален перед ферментативным анализом из окисляемой смеси опыта, этот способ наиболее специфичен.

Реактивы: 1) фосфатный буферный раствор (1,0 *M*, pH 7,5): 136 *г* KH_2PO_4 растворяют в 750 *мл* дистиллированной воды 10 н. раствором КОН, устанавливают pH 7,3, затем доливают дистиллированной водой до 1000 *мл*; 2) метаиодат натрия (4% в/о): 4 *г* $NaJO_4$ растворяют в дистиллированной воде и объем доводят до 100 *мл*; 3) стандартный раствор треонина (10^{-3} *M*): 11,9 *мг* *D,L*-треонина растворяют в бидистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*; 4) меркаптопропионат (10%, о/о, pH 6): 1 *мл* 3-меркаптопропионовой кислоты растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, титруют 10 н. КОН до pH 6, доливают дистилли-

ванной водой до 10 *мл*; 5) восстановленный никотинамидаденин-динуклеотид ($2{,}5 \cdot 10^{-3}$ М НАД-H_2): 7 *мг* НАД-Н-Na_2 растворяют в дистиллированной воде и объем доводят до 3 *мл*; 6) алкогольдегидрогеназа, АДГ (0,6 *мг* белка на 1 *мл*): взвесь фермента разводят в растворе сульфата аммония раствором, содержащим в 100 *мл*: 0,1 *г* альбумина сыворотки рогатого скота, 0,307 *г* глютатиона и 0,769 *г* пирофосфата калия ($K_4P_2O_7 \cdot 3H_2O$); pH этого раствора устанавливают равным 7,5 добавлением 1 н. раствора HCl.

Растворы 3—6 сохраняют при 16°. Растворы 4 и 5 еженедельно готовят свежими. Взвесь фермента в растворе сульфата аммония сохраняют при 16°. Разведенный раствор фермента сохраняется в течение 1 недели при 16°.

Т е х н и к а. *Подготовка исследуемого материала.* Описанный здесь способ разработан для определения активности синтетазы треонина. Проведенные опыты показали, что он пригоден также и для определения треонина в гидролизатах белка. Кислотные гидролизаты, содержащие приблизительно 0,1 *мг* белка, перед определением нейтрализуют и разводят в 10 раз.

Постановка опыта. Значение pH смеси опыта компромиссно между оптимальными значениями pH при окислении периодатом и реакции АДГ. Выбор 3-меркаптопропионата в качестве восстанавливающего средства произволен. Другие меркаптаны, вероятно, также пригодны, поскольку они не нарушают реакцию АДГ. Измерение ведут при 340 *ммк*, толщина слоя 1 *см*, объем измеряемой жидкости 1 *мл*; комнатная температура (около 25°). Измерение ведут против воды. Одновременно можно измерять 3 кюветы.

В кюветы отмеряют пипеткой: пробу (содержит от 0,02 до 0,1 *мкмоля* треонина), 0,10 *мл* буферного раствора фосфата (1), дистиллированной воды до 0,87 *мл*, 0,02 *мл* раствора иодата (2). Все хорошо перемешивают, оставляют на 30 сек. для осуществления реакции. Затем вносят 0,03 *мл* раствора меркаптопропионовой кислоты (4), перемешивают 30 сек. и добавляют (при перемешивании) 0,05 *мл* раствора АД-H_2 (5).

2 раза измеряют эстинкцию E_1. При полном восстановлении иодата экстинкция не уменьшается. После этого вносят, помешивая, 0,03 *мл* раствора АДГ [1] (6); через каждые 30 сек. измеряют экстинкцию до прекращения изменений (конечное значение: E_2).

Стандартные растворы: вместо пробы вносят 0,02—0,10 *мл* стандартного раствора *D*, *L*-треонина (3), соответствующие 0,02—0,10 *мкмоля* *D*, *L*-треонина.

Вычисление. Изменение экстинкции при 340 *ммк* в результате добавления фермента (при поправке на разведение смеси опыта) линейно пропорционально содержанию треонина в пределах концентраций между 0,01 и 0,1 *мкмоля*/опыт. Однако, по невыясненным

---

[1] Применяют столько фермента, чтобы реакция заканчивалась через 1—3 мин. Бо́льшие количества уменьшают специфичность анализа.

до сих пор причинам, значения, получаемые по формуле

$$\frac{0,97 \cdot E_1 - E_2}{6,22} = \textit{мкмолям треонина/опыт},$$

где 0,97— поправка на разведение опыта вследствие добавления фермента; 6,22—коэффициент экстинкции НАД-H_2 при длине волны 340 *ммк* (*см*^{2}/*мкмоль*), оказываются на 33—58% завышенными.

Поэтому значения измерений $\Delta E_{пр} = E_1 - E_2$ (непоправленные) проб относят к значениям измерений стандартных растворов $\Delta E_{станд}$. При использовании 0,10 *мл* стандартного раствора *D*, *L*-треонина (3) соответствующего 0,10 *мкмоля* *D*, *L*-треонина:

$$\frac{\Delta E_{пр}}{\Delta E_{станд}} = 10 \textit{ мкмолей треонина/опыт}$$

Источники ошибок. Гидролизаты белка содержат иногда загрязнения, реагирующие с иодатом, но без образования при этом ацетальдегида. В таком случае можно удвоить концентрации иодата и меркаптана в опыте.

Соединения, подобные серину, реагирующие с иодатом с образованием формальдегида, не нарушают реакции. Некоторые альдегиды с длинной цепью окисляют НАД-H_2 в присутствии алкогольдегидрогеназы, однако эти реакции протекают медленнее, чем с ацетальдегидом. Ошибок можно избежать,если применять такое количество фермента, чтобы реакция заканчивалась через 1—3 мин. Лишь немногие встречающиеся в природе соединения реагируют с иодатом при нейтральном значении pH и в короткое время с образованием ацетальдегида.

Соединения, подобные бутиленгликолю и сам ацетальдегид удаляются общепринятыми методами [1] (нагревание, диализирование, осаждение) при обработке материала исследования. Нарушения могут появиться, когда имеются полимеры, дающие при гидролизе сахара (например, метилпентозы, 6-дезоксиглюкоза, фукоза, рамноза). Присутствие таких сахаров в гидролизате должно быть при этом проверено. С другой стороны, описанный здесь метод, возможно, пригоден и для определения метилпентоз. Точность метода может быть доведена до 2%.

Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

Определение лизина [8]

Дикерман и Лоуке предложили метод количественного определения лизина, основанный на его ферментативном декарбоксилировании при помощи декарбоксилазы 1 из Bacillus cadaveris и спектрофотометрическом определении образующегося кадаверина

[1] C. Huggins a. O. Miller. J. Biol. Chem., 1956, 221, 377.

в виде его 2,4-динитрофенилпроизводного. Исследуемую пробу смешивают с 1,0 *мл* 0,2 *М* малатного буфера (pH 6,0) и 0,1 *мл* 0,02%-ного раствора пиридоксальфосфата (водного), доводят объем дистиллированной водой до 2,1 *мл*, добавляют 0,2 *мл* суспензии коммерческого препарата декарбоксилазы 1 (100 *мг* ацетонового порошка суспендируют в 10 *мл* 0,1 *М* фосфатного буфера, pH 7,0, центрифугируют 15 мин. при 3100 *g* и осадок ресуспендируют в 10 *мл* дистиллированной воды), инкубируют 30 мин. при 38°, добавляют 0,1 *мл* 2,3 н. соляной кислоты, выдерживают 10 мин. при 38° и центрифугируют 15 мин. при 3100 *g*.

1 *мл* надосадочной жидкости смешивают с 0,04 *мл* 0,0125%-ного раствора диэтилдитиокарбамата натрия, добавляют 0,1 *мл* 0,14%-ного раствора 2,4-динитрофторбензола в абсолютном спирте и 0,6 *мл* карбонатного буфера (1,2 *г* $NaHCO_3$ + 10,6 *г* Na_2CO_3 + дистиллированная вода до 500 *мл*), инкубируют 1 час при 65°, охлаждают 10 мин. до 25°, перемешивают 60 сек. с 5 *мл* хлороформа в специальном смесителе и центрифугируют 5 мин. при 800 *g* для разделения слоев. 2 *мл* хлороформного экстракта последовательно промывают 2 *мл* 1 н. соляной кислоты и 2 *мл* 1 н. едкого натра путем перемешивания и центрифугирования, как описано выше и фотометрируют при 355 *ммк* [8].

По данным авторов [8], предложенный метод обладает в 60 раз более высокой чувствительностью по сравнению с аналогичным манометрическим методом и может быть использован для определения лизина в сыворотке крови и моче.

α-ε диаминопимелиновая кислота, аспарагин, *D*, *L*-орнитин и NH_4Cl образуют в указанных условиях окрашенные соединения, мешающие определению лизина, однако интенсивность развивающейся при этом окраски в 10—100 раз ниже, чем образующаяся в присутствии лизина. α-ε-аминокаприловая кислота и тирозин конкурентно тормозят ферментативное декарбоксилирование лизина более чем на 10%, если концентрация их в 17 раз больше концентрации лизина. Другие аминокислоты, а также креатинин, мочевая кислота, гуанидинуксусная кислота, мочевина, креатин и другие соединения не мешают определению лизина.

При помощи описанного метода определено, что содержание лизина в плазме крови человека колеблется в пределах 0,15—0,24 *мкмоля/мл* (среднее значение 0,18 *мкмоля/мл*). Метод пока не проверен другими лабораториями.

Определение глутамина и аспарагина [9]

П р и н ц и п. Дезаминирование глутамина и аспарагина катализируется специфическими дезаминазами, выделенными из чистой культуры Pseudomonas. Образующийся аммиак количественно определяют по цветной реакции с фенолятом в присутствии нитропруссида; оптическую плотность окрашенного раствора измеряют при 640—700 *ммк*.

Р е а к т и в ы: 1) глутаминаза[1] аспарагиназа (100 *ед/мл*), исходный раствор фермента (приготовление см. Приложение) после оттаивания разводят боратно-ацетамидным буфером (0,01 *М*, pH 7,6, см. стр. 338); 2) насыщенный раствор углекислого калия; 3) 0,1 н. серная кислота; 4) фенолят натрия, 2,5%-ный раствор; 5) нитропруссид натрия, 0,005%-ный раствор; 6) 0,05 *М* карбоната натрия; 7) 0,06 *М* раствор гипохлорита натрия; 8) 0,01 *М* раствор бромкрезолового зеленого; 9) исходный стандартный раствор сернокислого аммония с конечной концентрацией 0,15 *мкмолей* в 1 *мл*; 10) исходный стандартный раствор глутамина, содержащий 0,02 *мг* глутамина в 1 *мл*; готовят, растворяя 20 *мг* глутамина в 100 *мл* воды, и затем разбавляют 10 *мл* этого раствора до 100 *мл*.

Т е х н и к а. *Подготовка исследуемого материала.* Оксалатную кровь или плазму, в количестве 0,1—0,02 *мл*, вносят в склянки емкостью 15 *мл*, добавляют 0,9 *мл* воды и 0,02 *мл* разбавленного раствора фермента. Склянки инкубируют при 37° в течение 10 мин. при постоянном встряхивании. По прошествии этого промежутка времени в каждую склянку добавляют по 0,5 *мл* насыщенного раствора карбоната калия и немедленно закрывают резиновой пробкой, через которую пропущена стеклянная палочка с матовой поверхностью, смоченная 1 н. раствором серной кислоты (3). Склянки укрепляют на оси мотора и вращают в горизонтальном положении в течение 20—30 мин. Пробки открывают и пленку, образовавшуюся на стеклянной палочке, смывают 2 *мл* воды в кювету спектрофотометра, после чего в каждую кювету последовательно добавляют по 1 *мл* следующих реактивов: 2,5% раствора фенолята натрия (4), 0,005% раствора нитропруссида натрия (5), 0,05 *М* углекислого натра (6) и 0,06 *М* гипохлорита калия (7). Содержимое кювет перемешивают и оставляют в темноте на 30 мин. для наиболее полного развития окраски, а затем фотометрируют при 640—700 *ммк* против слепой пробы, не содержащей фермента, или заменяя исследуемый материал на 0,1 *мл* 0,01 *М* раствора бромкрезолового зеленого (8).

Построение калибровочных кривых (см.[2] стр. 49). Приготовляют серию разведений исходного стандартного раствора сульфата аммония со следующим нарастающим рядом концентраций: 0,01; 0,015; 0,03; 0,09; 0,12 и 0,15 *мкмолей* аммиака в 1 *мл*. Определение аммиака в каждом разведении производится вышеописанным методом, полученные величины оптической плотности, за вычетом показания контрольного определения, наносят против соответствующих концентраций.

Для построения калибровочной кривой глутамина готовят серию разведений из его исходного стандартного раствора, содержащего 0,02 *мг мл* глутамина; с этой целью отмеривают пипеткой аликвотные количества стандартного раствора и готовят ряд разведений,

---

[1] КФ 3.5.1.2.

с содержанием глютамина 2; 4; 6; 8; 10; 12; 14; 16 и 18 *мкг/мл*. Проведя анализ всех разведений, строят график, нанося оптические плотности против концентраций.

Обработка бутанолом. Охлажденный клеточный экстракт в количестве около 800 *мл* смешивают с половинным или равным объемом охлажденного до 0° бутанола и смесь центрифугируют при 20000*g* в течение 30 мин. Слой бутанола, собирающийся поверх водного слоя, отбрасывают, нижний водный слой сохраняют. Остающийся после экстракции густой осадок экстрагируют повторно равным объемом боратно-ацетамидного буфера, полученный экстракт присоединяют к водному слою. Соединенный экстракт сгущают в вакууме до объема 200 *мл*.

Обработка хлористым барием. С целью удаления некоторых полисахаридов к надосадочной жидкости добавляют 6 *мл* 1 *М* хлористого бария на литр, образующийся осадок удаляют центрифугированием при 20 000 *g*.

Фракционирование сернокислым аммонием. Осторожным добавлением насыщенного раствора сульфата аммония, содержащего гидроокись аммония, в количестве, достаточном для доведения реакции раствора до pH 7, достигают 60%-ного насыщения, при этом из центрифугата выпадает осадок, который удаляют центрифугированием. К надосадочной жидкости добавляют сульфат аммония до 80%-ного насыщения. Осадки объединяют, растворяют в 0,001 *М* боратно-ацетамидного буфера и диализуют против этого же буфера в течение 9 час., каждый час сменяя диализирующую жидкость.

Диализованный ферментный раствор доводят до объема 200 *мл* и фракционирование сульфатом аммония повторяют.

Фракционирование на ДЭАЭ-целлюлозе. Подготовляют колонку ДЭАЭ-целлюлозы размером 1 ×15 *см* и уравновешивают ее боратно-ацетамидным буфером. Диализованный раствор фермента, содержащий около 160 *мг* белка, наносят на колонку вместе со 100 *мл* указанного буфера. Элюцию ведут вначале 0,03 *М* фосфатным буфером, pH 6,8, содержащим 0,01 *М* бората и ацетамида, после чего тем же буферным раствором, но со сниженной концентрацией фосфата до 0,05 *М*. Элюаты собирают в приемники емкостью 7 *мл*.

Из элюата осаждают фермент сульфатом аммония при 80%-ном насыщении, как описано выше, осадок растворяют в небольшом количестве боратно-ацетамидного буфера и диализируют против этого же буфера до полного удаления аммония.

Ферментный препарат может храниться долгое время в замороженном состоянии или при температуре рефрижератора без заметной потери активности.

Описанный метод высоко специфичен при определении глютамина и аспарагина в биологических жидкостях. Гемолиз не препятствует определению указанных амидов в крови данным методом, который с успехом может быть также применен для определения чистоты препаратов глютамина и аспарагина.

П р и л о ж е н и е. *Техника* получения препарата глютаминазы-аспарагиназы заключается в следующем. Микроорганизмы, идентифицированные как Pseudomonas, культивируют на среде, 1 *л* которой содержит следующие реактивы: по 4 *г* однозамещенного глютамата натрия, глюкозы и сульфата аммония, 0,625 *г* двузамещенного фосфата калия, 0,14 *г* сернокислого магния гептагидрата и по 6 *г* сернокислого железа гептагидрата, сернокислого марганца моногидрата и поваренной соли. Добавлением некоторого количества раствора едкого натра реакция среды доводится до pH 7. После 8—10-часовой инкубации бактериальные клетки отделяют центрифугированием и сохраняют при —15°.

Для приготовления ферментного препарата оттаивают 500 *мг* бактериальной массы и суспендируют ее в 1 *л* буферного раствора, содержащего 0,1 *M* бората и 0,01 *M* ацетамида, pH 7,6. Все операции проводят при температуре 0—3 . Суспензию бактериальных клеток озвучивают, полученный продукт центрифугируют при 20 000 *g* при 0°, надосадочную жидкость сохраняют для дальнейшей очистки. Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

Данных других лабораторий о проверке этого метода пока не имеется.

Определение *L*-аспарагиновой кислоты и *L*-аспарагина [10]

П р и н ц и п. Глютамат-оксалацетаттрансаминаза (ГОТ) превращает α-кетоглютаровую кислоту в присутствии *L*-аспарагиновой кислоты в *L*-глютаминовую кислоту:

$$\alpha\text{-кетоглютарат} + L\text{-аспартат} \xrightleftharpoons{\text{ГОТ}} L\text{-глютамат} + \text{оксалацетат}. \qquad (1)$$

Малатдегидрогеназа[1] (МДГ) восстанавливает оксалацетат в присутствии НАД-H_2 в *L*-малат:

$$\text{оксалацетат} + \text{НАД-Н} + H^+ \xrightleftharpoons{\text{МДГ}} L\text{-малат} + \text{НАД}^+. \qquad (2)$$

За уменьшением концентрации НАД-H_2 следят по экстинкции при 340 или 336 *ммк*. Равновесие реакции (2) $K \cdot 4,3 \cdot 10^4$ l/*моль* при pH 7,2 и 22° полностью сдвинуто в сторону образования малата. Константа Михаэлиса фермента в отношении *L*-аспартата очень невелика. *L*-аспартат количественно превращается в *L*-(+)-малат и при этом окисляется стехиометрическое количество НАД-H_2.

МДГ и ГОТ должны быть по возможности свободными от активности дегидрогеназы глютаминовой кислоты. Так как оба фермента сохраняют обычно в растворе сульфата аммония, то при избыточных количествах α-кетоглютарата и НАД-H_2 могло бы произойти

[1] КФ 1.1.1.37.

медленное восстановительное аминирование в глютаминовую кислоту с использованием НАД-H_2. Однако оба препарата легко могут быть изготовлены почти чистыми и неделями сохраняться при 0—4° без заметной потери активности.

Р е а к т и в ы: 1) фосфатный буферный раствор (1/15 *М*, pH 7,2): а) 11,876 *г* $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ растворяют в бидистиллированной воде и объем доводят до 1000 *мл*, б) 9,078 *г* KH_2PO_4 растворяют в бидистиллированной воде и доливают ею до 1000 *мл*, *а* и *б* смешивают в объемных отношениях 72 : 28; 2) восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (около $1,2 \cdot 10^{-2}$ *М*): 50 *мг* НАД-H_2-Na_2 растворяют в 5 *мл* бидистиллированной воды; 3) α-кетоглютарат (0,1 *М*): 1,46 *г* α-кетоглютаровой кислоты при слабом нагревании растворяют приблизительно в 50 *мл* бидистиллированной воды, нейтрализуют 2н. раствором едкого натрия и доливают водой до 100 *мл*; 4) малатдегидрогеназа, МДГ (2,5 *мг* белка на 1 *мл*): основную взвесь разбавляют 2,8 *М* раствором сульфата аммония; 5) глютамат-оксалацетаттрансаминаза, ГОТ (2,5 *мг* белка на 1 *мл*): основную взвесь разбавляют соответственно 1,6 *М* раствором сульфата аммония.

Т е х н и к а. *Подготовка исследуемого материала.* Экстракты тканей и гидролизаты белка предварительно обрабатывают, как описано при определении аланина на стр. 329. Для определения аспарагина, наряду с аспарагиновой кислотой, нагревают аликвотную часть раствора пробы в течение 2 час. с 1н. HCl на кипящей водяной бане, охлаждают, нейтрализуют 2н. раствором NaOH и доливают дистиллированной водой до определенного объема (см. ниже). Этот раствор применяют для опыта. Получают сумму аспарагин + аспарагиновая кислота [1].

Постановка опыта. Измерение ведут при 340 или 366 *ммк*; толщина слоя 1 *см*, объем измеряемой жидкости 3 *мл*, температура комнатная.

Последовательно отмеряют в кюветы: 2,76 *мл* буферного раствора (1); 0,10 *мл* предварительно обработанной пробы; 0,05 *мл* раствора НАД-H_2 (2); 0,02 *мл* взвеси МДГ (4); 0,02 *мл* взвеси ГОТ (5). Смешивают, измеряют экстинкцию E_1; реакцию начинают, добавляя 0,05 *мл* раствора кетоглютарата (3). Реакция заканчивается не позднее чем через 10 мин. Измеряют экстинкцию E_2. Если экстинкция и дальше продолжает медленно уменьшаться, то E_2 экстраполируют к «нулевому» времени начала реакции [2].

---

[1] Для ферментативного определения аспарагина пробу не гидролизуют, но после проведения реакции с аспарагиновой кислотой в опытную смесь добавляют аспарагиназу. Новое измерение экстинкции соответствует содержанию в пробе аспарагина.

[2] В тех случаях, когда после окончания ферментативной реакции величина экстинкции продолжает «скользить» (одной из причин чего могут являться примеси других ферментов и др.), рекомендуется построить график, нанося на ординаты величины экстинкции и на абсциссу время в минутах; «нулевым» временем (t_0) считают начало реакции с ферментом. Детали см. H. B e r g m e y e r. Methoden der enzymatischen Analyse. Weinheim. 1962, S. 39.

Вычисление. $E_2 - E_1 = \Delta E$ входит в вычисление. Ошибка вследствие разведения раствора добавлением 0,05 *мл* раствора кетоглютарата должна быть учтена при небольших значениях для ΔE. Она исключается посредством умножения E_1 на $3{,}00:3{,}05 \approx 0{,}98$. Для измерения при 366 *ммк* имеем:

$$\frac{\Delta E \cdot 3 \cdot 133}{3{,}3 \cdot 10^{-3}} = \text{мг аспарагиновой кислоты (в кювете)},$$

где $3{,}3 \cdot 10^{-3}$ — коэффициент экстинкции НАД-H_2 при 366 *ммк* (*см*^{2}/*ммоль*); 133—молекулярный вес аспарагиновой кислоты; 3— объем опыта (*мл*).

Если измерение ведут при 340 *ммк*, то коэффициент экстинкции НАД-H_2 будет $6{,}22 \cdot 10^3$ *см*^{2}/*ммоль*.

Содержание аспарагина в пробе вычисляется из разницы измерений проб (гидролизованных) и без предварительного кислотного гидролиза. Молекулярный вес аспарагина (132, 12) и аспарагиновой кислоты (133,10) почти не отличаются один от другого.

Специфичность метода и источники ошибок. Реакция трансаминирования очень специфична. Превращаются только *L*-аспартат и сульфоновый аналог — цистеиновая кислота; однако последняя реагирует гораздо медленнее. Реакция цистеиновой кислоты долгое время протекает линейно и может, таким образом, быть исключена посредством экстраполяции. Цистеиновая кислота может образоваться при гидролизе цистеина и цистеинсодержащих белков и пептидов в присутствии кислорода. Оксалацетат при концентрации выше 10^{-4} *М* мешал бы анализу вследствие дополнительного использования НАД-H_2. Однако, как правило, это не относится к тканям, так как концентрация оксалацетата в них большей частью очень мала. В некоторых случаях значение оксалацетата должно быть вычислено отдельно и вычтено из найденного значения аспартата[1], или E_1 измеряют только в том случае, если прореагировал весь оксалацетат. *D*-аспартат может быть определен вычитанием из совокупной концентрации аспартата, найденной с нингидрином (после хроматографического или электрофорезного разделения), концентрации *L*-аспартата, полученной ферментативным путем. При исследовании гидролизатов белка результаты анализов, полученные описанным здесь методом, очень хорошо согласовались с результатами, полученными химическим путем при разделении ионообменной хроматографией. Точность метода 3%. Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

---

[1] Для определения содержания оксалацетата в пробе измеряют экстинкцию до и после добавления МДГ. Из разницы экстинкций вычисляется содержание оксалацетата по вышеприведенной формуле, когда 3 заменяют 2,7 и 133—132.

Определение *L*-глютаминовой кислоты и *L*-глютамина [11]

Определение посредством глютаматдегидрогеназы[1]

Принцип. Глютаматдегидрогеназа (ГЛДГ) катализирует реакцию

$$L\text{-глютамат} + \text{НАД}^+ + H_2O \rightleftarrows \alpha\text{-кетоглютарат} + \text{НАД-}H_2 + NH_4^+. \qquad (1)$$

Равновесие лежит далеко на левой стороне. Посредством улавливания α-кетоглютарата гидразином при большом избытке НАД и в щелочной среде (pH 9) *L*-глютамат может быть превращен количественно в α-кетоглютарат. Измеряют увеличение экстинкции НАД-H_2 при 340 или 366 *ммк*.

ГЛДГ должна обладать специфической активностью по меньшей мере в 3 единицы[2] на *мг* белка. Фермент должен быть свободен от глютаминазы.

Реактивы (приблизительно для 20 определений). Все растворы изготовляют на свежеприготовленной бидистиллированной воде. Для того чтобы препятствовать росту микроорганизмов, колбы пропаривают: 1) буферный раствор глицин/гидразина (0,5 *М* глицина, 0,4 *М* гидразина, pH 9): 3,75 *г* глицина и 5,50 *г* приблизительно 24%-ного гидразингидрата растворяют в бидистиллированной воде, устанавливают 1н. серной кислотой pH равное 9, доливают бидистиллированной водой до 100 *мл*; 2) никотинамидадениндинуклеотид (около $3 \cdot 10^{-2}$ *М* НАД): 100 *мг* НАД растворяют в 5 *мл* бидистиллированной воды; 3) глютаматдегидрогеназа, ГЛДГ (около 10 *мг* белка на 1 *мл*): взвесь в случае необходимости разводят 0,15 *М* раствором Na_2SO_4.

Для анализа проб, содержащих белок, готовят дополнительно: 4) хлорная кислота (около 0,6 *М*): 5,2 *мл* 70%-ной кислоты разводят бидистиллированной водой до 100 *мл*; 5) фосфат (2 *М*, pH≈12): 21,2 *г* K_3PO_4 и 18,3 *г* K_2HPO_4 растворяют в дистиллированной воде, объем доводят до 100 *мл*.

Раствор НАД сохраняют при 0—4°, возобновляют приблизительно через каждые 2 недели. Специфическую активность взвеси ГЛДГ проверяют каждый месяц. Взвесь сохраняют при 0—4°. Буферный раствор сохраняется при комнатной температуре.

Техника. *Подготовка исследуемого материала.* Препараты глютаминовой кислоты, гидролизаты белка и прочие смеси аминокислот разводят настолько, чтобы они содержали не более 150 *мкг* *L*-глютамата на 1 *мл*. Мясные экстракты, кубики бульона и т. д. для изготовления гомогенных растворов нагревают в воде до кипения, охлаждают и фильтруют. Жир остается на фильтре.

---

[1] КФ 1.4.1.2.

[2] Единицей считают количество фермента, которое в течение 1 мин. превращает 1 *мкмоль* *L*-глютамата.

Ионы аммония (см. «Источники ошибок») удаляют до определения: лиофилизируют пробу, установленную на pH 9. Если раствор пробы, несмотря на разведение, еще сильно окрашен, то глютамат отделяют посредством адсорбции на катионите (например, Амберлит IR 120) и элюированием посредством 1н. HCl. Элюат анализируют. Детали см. [11].

Кровь. 5,00 *мл* крови перемешивают с 5,00 *мл* хлорной кислоты (4), 10 мин. центрифугируют при 3000 *g*. В 3,00 *мл* надосадочной жидкости устанавливают pH 9, добавляя 0,8 *мл* раствора фосфата (5), 10 мин. отстаивают на ледяной бане, фильтруют через маленький складчатый фильтр. Доводят до комнатной температуры; анализируют 1,00 *мл* фильтрата.

Постановка опыта для проб, свободных от белка. Измерение ведут при 340 или 366 *ммк*; толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 3,45 *мл*, комнатная температура (20—24°).

Для каждой серии опытов ставят слепой опыт на реактивы с водой вместо пробы [1]. Измерение ведут против воздуха или воды.

Отмеривают пипеткой в 1 *см* кювету 3,00 *мл* буферного раствора (1); 0,20 *мл* пробы (или бидистиллированной воды при слепом опыте); 0,20 *мл* раствора НАД (2). Смешивают шпателем из пластмассы и измеряют начальную экстинкцию. Затем вносят, помешивая, 0,05 *мл* взвеси ГЛДГ (3). Дают стоять в покое главному и слепому опытам около 30 мин. Для каждого опыта между добавлением раствора НАД и измерением конечной экстинкции должно пройти одинаковое количество времени (см. «Источники ошибок»). Измеряют конечную экстинкцию. Определяют разницу между конечной и начальной экстинкциями для главного и слепого опыта ($\Delta E_{пр}$ и $\Delta E_{сл}$). $\Delta E = \Delta E_{пр} - \Delta E_{сл}$ входит в вычисление.

Вычисление. При 340 *ммк*:

$$\frac{\Delta E \cdot 3{,}45}{6{,}22 \cdot 0{,}2} = \Delta E \cdot 2{,}77 = \text{мкмолей } L\text{-глутамата в 1 мл пробы.}$$

При 366 *ммк*

$$\frac{E \cdot 3{,}45}{3{,}30 \cdot 0{,}2} = E \cdot 5{,}23 = \text{мкмолей } L\text{-глутамата в 1 мл пробы,}$$

где 3,45 — объем опыта (*мл*), 0,2 — объем раствора пробы в опыте (*мл*), 6,22 — коэффициент экстинкции НАД-H_2 при 340 *ммк* (*см*^{2}/*мкмоль*), 3,30 — коэффициент экстинкции НАД-H_2 при 366 *ммк* (*см*^{2}/*мкмоль*).

---

[1] НАД образует с гидразином соединение, абсорбирующее при 340 *ммк*, абсорбция которого еще значительна при 366 *ммк*. Слепая реакция в первые секунды происходит очень быстро (увеличение экстинкции до 0,030), затем она медленно изменяется со скоростью ΔE/30 мин. от 0,005 до 0,020. Таким образом, необходимо после добавления НАД сохранять время точно одинаковым для главного и слепого опыта.

То же относится ко всем реакциям с НАД и гидразином в опыте, например для определения *L*-лактата (стр. 186) и глицерин-1-фосфата (стр. 228).

Для перечисления на *мкг* значения *мкмолей* следует умножить на молекулярный вес глутаминовой кислоты (146).

Пример. Жидкие бульоны: 810 *мг* были разведены H_2O до 100 *мл* (8,10 *мг/мл*). Для опыта разводят еще 1 : 50. Анализируют 0,20 *мл* этого раствора. Измеряют против воздуха при 366 *ммк*. Экстинкция пробы 0,200, экстинкция слепого опыта реактивов 0,085; $\Delta E = 0{,}115$.

0,115·5,23 = 0,6 *мкмоля* *L*-глутамата/*мл* раствора пробы

0,6·146 = 87,5 *мкг* *L*-глутаминовой кислоты/*мл* раствора пробы.

Так как навеска пробы составляла 8,10 *мг/мл* и предварительное разведение составляло 1 : 50, то бульон содержит

$$\frac{0{,}0875 \cdot 50 \cdot 100}{8{,}10} = 54 \text{ мкг \% } L\text{-глутамата.}$$

Постановка опыта для проб, содержащих белки. Измерение ведут при 340 или 366 *ммк*; толщина слоя 2 *см*, объем анализируемой жидкости 4,25 *мл*, комнатная температура (20—24°).

Для каждой серии опытов готовят слепой опыт из реактивов с водой вместо пробы. Измерение ведут против воздуха или воды. Отмеривают пипеткой в кюветы (2 *см*): 1,00 *мл* нейтрализованного фильтрата (пробы), 3,00 *мл* буферного раствора (1); 0,20 *мл* раствора НАД (3). Смешивают пластиковым шпателем и измеряют начальную экстинкцию. Вносят, помешивая, 0,05 *мл* взвеси ГЛДГ (4). Дают стоять в покое в течение 60 мин. главному и слепому опыту. Для каждой смеси между добавлением НАД и измерением конечной экстинкции должно пройти одинаковое количество времени (см. «Источники ошибок»). Измеряют конечную экстинкцию. Определяют разницу между конечными и начальными экстинкциями для главного и слепого опыта ($\Delta E_{пр}$ и $\Delta E_{сл}$). $\Delta E = \Delta E_{пр} - \Delta E_{сл}$ входит в вычисление.

Вычисление. В приведенных условиях, при содержании *L*-глютамата в определяемой пробе до 30 *мкг*, реакция протекает стехиометрически. При объеме кюветы 4,25 *мл* и толщине слоя 2 *см* $\Delta E = 0{,}100$ соответствует при 340 *ммк* 0,0342 *мкмолям* (4,49 *мкг*) *L*-глютамата: при 366 *ммк* 0,0644 *мкмолям* (9,40 *мкг*) *L*-глютамата.

Для того чтобы получить содержание глютамата в 1 *мл* крови или в 1 *г* свежей ткани, следует учитывать разведения при очистке от белка и нейтрализации. Кровь содержит жидкость в количестве около 80% от своего веса. 1,0 *мл* крови весит 1,06 *г*. При введении 5,00 *мл* крови вес ее составляет 5,3 *г*, очистка от белка дает 5 + (5,3·80/100) = 9,24 *мл* экстракта. Из них 3 *мл* нейтрализуются 0,8 *мл* раствора фосфата; из этого объема (3,8 *мл*) в опыт вносят 1,0 *мл*. Исходя из этого получают фактор разведения (9,24/5)·(3,8/3)·(1/1) = 2,34.

При 20%-ном гомогенате, т. е. содержащем 1/5 часть ткани, нейтрализации 3,00 *мл* его посредством 1,8 *мл* фосфатного буферного

раствора и введении в опыт 1,0 *мл* получают фактор разведения (5/1)·(4,8/3)·(1/1) = 8,0.

Таким образом получают:

для измерения при 340 *ммк*:

$\Delta E \cdot 117 =$ *мкг* *L*-глютамата/*мл* крови, $\Delta E \cdot 399 =$ *мкг* *L*-глютамата/*г* ткани;

для измерения при 366 *ммк*:

$\Delta E \cdot 220 =$ *мкг* *L*-глютамата/*мл* крови, $\Delta E \cdot 752 =$ *мкг* *L*-глютамата/*г* ткани.

Пример. Анализировали 1 *г* мышиной печени. Измеряли при длине волны, равной 366 *ммк*:

	Слепой опыт реактивов	Проба
Начальная экстинкция	0,146	0,319
Конечная экстинкция	0,176	0,580
	$\Delta E_{сл} = 0,030$	$\Delta E_{пр} = 0,261$

$$\Delta E = \Delta E_{пр} - \Delta E_{сл} = 0,231$$

0,231·752 = 174 *мкг* *L*-глютамата/*г* печени.

Глютамин, *D*-глютамат, *L*-аспартат, пирролидонкарбоновая кислота и другие производные глютаминовой кислоты не мешают определению.

Источники ошибок. Определению мешают ионы аммония, которые поэтому должны быть удалены (см. «Техника»). Неточно засеченное время при отмеривании пипеткой раствора НАД в слепой и основной опыт приводит к неправильным значениям. Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

Определение, проводимое посредством глютаматдегидрогеназы[1] *и лактатдегидрогеназы*[2]

Принцип. Глютаматдегидрогеназа (ГЛДГ) катализирует реакцию:

$$L\text{-глютамат} + НАД^{+} + H_2O \leftrightharpoons \alpha\text{-кетоглютарат} + НАД\text{-}H_2 + NH_4^{+}. \quad (1)$$

Равновесие при pH 7 полностью сдвинуто влево. Однако оно может быть посредством применения высоких концентраций ДПН, освобождения раствора от ионов NH_4^{+} в начале реакции, а также посредством постоянного окисления образовывающегося НАД-H_2 вновь в НАД полностью перенесено в пользу кетоглютарата. Для этого присоединяют реакцию (1) к реакции (2), катализируемой лактатдегидрогеназой (ЛДГ):

$$\text{Пируват} + НАД\text{-}H + H^{+} \leftrightharpoons \text{лактат} + НАД^{+}. \quad (2)$$

[1] (КФ 1.4.1.2 1.4.1.3. 1.4.1.4).
[2] (КФ 1.1.1.27 1.1.1.3).

Реакция (2) должна протекать достаточно быстро, для того чтобы сохранить концентрацию НАД-H_2 малой, а концентрацию НАД большой, пока весь глютамат не превратился в α-кетоглютарат. После денатурирования нагревания ГЛДГ и ЛДГ α-кетоглютарат определяется посредством нового добавления ГЛДГ и ионов NH_4^+ по уравнению (1) (ср. стр. 205). Измеряют уменьшение экстинкции НАД-H_2 при 366 *ммк*. Если в исследуемом растворе имеется α-кетоглютарат, то его следует определить отдельно и вычесть.

ГЛДГ должна иметь специфическую активность, равную по меньшей мере 175 единицам на 1 *мг* белка, а ЛДГ по меньшей мере 1200 единиц на 1 *мг* белка. Оба фермента должны быть свободны от глютаминазы. ГЛДГ не должна содержать больше 0,02 единицы ЛДГ на 1 *мл*.

Реактивы: 1) фосфатный буферный раствор (0,2 *М*, pH 7,6): 88,5 *мл* раствора (бидистиллят), содержащего 35,65 *г* $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ в 1000 *мл*, смешивают с 11,5 *мл* водного раствора (бидистиллят), содержащего 27,22 *г* KH_2PO_4 в 1000 *мл*; 2) триэтаноламиновый буферный раствор (0,2 *М*, pH 7,6): 9,3 триэтаноламин-гидрохлорида растворяют приблизительно в 200 *мл* бидистиллированной воды, добавляют 3,7 *г* ЭДТА-$NaH_2 \cdot 2H_2O$, устанавливают pH 7,6, приливая около 9 *мл* 2н. NaOH, и доводят объем жидкости бидистиллированной водой до 250 *мл*; 3) ацетат аммония (2 *М*): 1,54 *г* ацетата аммония растворяют в бидистиллированной воде и доводят объем до 10 *мл*; 4) никотинамидадениндинуклеотид (около $2,5 \cdot 10^{-2}$ *М* β-НАД): 20 *мг* НАД растворяют в 1 *мл* бидистиллированной воды; 5) восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (около $8 \cdot 10^{-8}$ *М* β-НАД-H_2): 7 *мг* НАД H-Na_2 растворяют в 1 *мл* буферного раствора триэтаноламина (2); 6) пируват натрия (1 *М*): 1,1 *г* пирувата натрия растворяют в бидистиллированной воде и доводят объем до 10 *мл*; 7) лактатдегидрогеназа, ЛДГ (около 2 *мг* белка на 1 *мл*): лактатдегидрогеназа имеется в продаже только в виде взвеси в растворе сульфата аммония. Ее следует диализировать три раза по 4 часа против 70-кратного объема 0,01 *М* фосфатного буферного раствора pH 6,5 (10^{-3} *М* ПО ЭДТА). При этом препарат фермента разбавляется в 2—3 раза; 8) глютаматдегидрогеназа, ГЛДГ (около 20 *мг* белка на 1 *мл*): продажную взвесь применяют в растворе[1] Na_2SO_4; 9) хлорная кислота (около 6% в/в): 52 *мл* 70%-ной $HClO_4$ разводят в бидистиллированной воде и доводят объем до 1000 *мл*; 10) раствор едкого калия (около 2н.): 8 *г* KOH растворяют в бидистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*.

Раствор НАД-H_2 сохраняют при 0—5°, возобновляя приблизительно еженедельно. Специфическая активность диализированной ЛДГ незначительно уменьшается за 4—6 дней при 0—5°. Более старые растворы следует проверять на их активность. В случае

---

[1] Способ получения и приготовления раствора см. J. Olson a. C. Anfinsen. J. Biol. Chem., 1952, 197, 67.

необходимости применяют больший объем для опыта. Все остальные реактивы сохраняются практически неограниченное время при 0—5°. При этой температуре выкристаллизовывается часть фосфата в буферном растворе фосфата; перед употреблением следует обратить внимание на полное растворение.

Техника. *Исследуемый материал и очистка от белка.* Кровь и ткани очищаются от белка по методу, приведенному в разделе «Определение пирувата» (стр. 197). Для нейтрализации хлорнокислого экстракта к нему добавляют 2н. раствор КОН до pH 7,3—7,8 (индикаторная бумага). Раствору дают постоять 15 мин. при 0°, выпавший $KClO_4$ отцентрифуговывают. В хлорнокислом растворе и при pH 3,5 *L*-глютамат находится в такой форме, в которой по неизвестным до сих пор причинам он не может быть определен ферментативным путем.

В моче перед определением устанавливают для удаления ионов аммония pH 9,5 и лиофилизируют. То же относится ко всем материалам исследования, содержащим аммоний.

Препараты глютаминовой кислоты, гидролизаты белка и другие смеси аминокислот разбавляют настолько, чтобы анализируемая проба содержала самое большее 50 *мкг* (около 0,3 *мкмоля*) *L*-глютамата во взятой пробе.

Мясные экстракты, бульоны и др. нагревают до полного растворения в бидистиллированной воде и фильтруют. Жир остается на бумажном фильтре.

Постановка опыта. Предварительная ферментативная реакция: в центрифужную пробирку с отметкой на 4 *мл* отмеривают пипеткой: 3,00 *мл* (очищенной от белка) нейтрализованной пробы; 0,75 *мл* фосфатного буферного раствора (1); 0,04 *мл* раствора пирувата натрия (6); 0,12 *мл* раствора НАД (4); 0,04 *мл* раствора ЛДГ (7); 0,05 *мл* взвеси ГЛДГ (8).

Смесь нагревают на водяной бане 30 мин. при 37°. Затем для инактивации ферментов нагревают тотчас вслед за этим еще 15 мин. на кипящей водяной бане и охлаждают в холодной воде. Конденсированную воду верхнего края пробирки, осторожно наклоняя последнюю, смывают реакционным раствором, при необходимости доливают бидистиллированной водой до 4 *мл*, 5 мин. центрифугируют при 3000 *g*. Осадок выбрасывают. В аликвоте надосадочной жидкости определяют образовавшийся из *L*-глютамата α-кетоглютарат.

Определение α-кетоглютарата

Измерение ведут при 366 *ммк*; толщина слоя 2 *см*, объем анализируемой жидкости 3,5 *мл*. Измерение против дистиллированной воды или воздуха.

Последовательно отмеривают пипеткой в кювету: 3,00 *мл* надосадочной жидкости; 0,30 *мл* триэтаноламина буферного раствора (2); 0,10 *мл* раствора ацетата аммония (3); 0,05 *мл* раствора НАД-H_2 (5); перемешивают, измеряют начальную экстинкцию E_1 и вносят,

помешивая, 0,05 *мл* взвеси ГЛДГ (8). Реакция заканчивается через 5—10 мин. Измеряют конечное значение экстинкции (E_2). Через 5 мин. еще раз измеряют экстинкцию. Она меньше E_2, если ГЛДГ содержит ЛДГ больше допустимого количества [1]. Измеренное линейное падение экстинкции в конце реакции с кетоглютаратом является результатом восстановления пирувата, имеющегося согласно уравнению (2) в высокой концентрации. Посредством графической экстраполяции на начало реакции (добавление ГЛДГ) ошибка может быть устранена.

Разность экстинкций $\Delta E = E_1 - E_2$ входит в вычисление. Так как глютамат измеряют в виде α-кетоглютарата, необходимо отдельное определение уже имеющегося в исследуемом материале α-кетоглютарата [2]. Измеряют при только что описанных условиях, но применяют вместо 3,0 *мл* надосадочной жидкости после первоначальной ферментативной реакции 2,25 *мл* очищенного от белка нейтрализованного экстракта +0,75 *мл* бидистиллированной воды. ΔE поправляют на разность экстинкции ΔE кетоглютарата (см. «Вычисление»).

Вычисление.

$$\Delta E \text{ глютамат} = \Delta E - \Delta E \text{ кетоглютарата}$$

$$\frac{\Delta E \text{ глютамат} \cdot V \cdot 1{,}33}{\varepsilon d V_{\ddot{u}}} = \textit{мкмолям } L\text{-глютамат}/\textit{мл} \text{ очищенной от белка нейтрализованной пробы,}$$

где V — объем (3,5 *мл*); ε — коэффициент экстинкции НАД-H_2 (*см²/мкмоль*) ($\varepsilon_{366} = 3{,}30$; $\varepsilon_{340} = 6{,}22$; $\varepsilon_{334} = 6{,}08$); d — толщина слоя (2 *см*); $V_{\ddot{u}}$ — объем пробы, подвергшейся предварительной ферментативной реакции или надосадочной жидкости после очистки от белка (3 *мл*); 1,33 — перечисление объема надосадочной жидкости, предназначенной для определения кетоглютарата (3 *мл*), на объем смеси опыта для предварительной ферментативной реакции (4 *мл*).

Метод пригоден для определения глютамата в концентрациях от 0,2 до 1 *ммоля* в 1 *мл* нейтрализованного экстракта. При меньших концентрациях чувствительность может быть удвоена посредством измерения при длине волны в 334 или 340 *ммк*. В этом случае вводят половину объема раствора НАД-H_2.

Специфичность метода. Глютамин одновременно не определяется. D-глютамат, L-аспартат, пирролидонкарбоновая кислота и другие производные глютамата не окисляются глютаматдегидрогеназой.

---

[1] Специфическая активность ГЛДГ должна быть не менее 175 единиц на 1 *мг* белка, а ЛДГ — не менее 12 000 единиц на 1 *мг* белка (см. G. Buisenherz et al. Z. Naturforsch., 1953, **86**, 555).

[2] Измеренное значение кетоглютарата, вследствие лабильности кетокислот в нейтральных экстрактах, необязательно идентично с содержанием α-кетоглютарата в необработанном материале исследования. Относительно другого ферментного метода определения α-кетоглютарата в тканях см. [27].

Маис и др. [12] разработали метод количественного определения глютаминовой и формиминоглютаминовой кислот, основанный на реакции, катализируемой глютаматдегидрогеназой. При анализе формиминоглютаминовой кислоты предварительно проводили щелочной гидролиз до глютаминовой кислоты. Анализ проводили спектрофотометрическим методом по увеличению оптической плотности НАД-H_2 при 340 *ммк*.

В интервале концентраций глютаминовой кислоты $1{,}2 \cdot 10^{-5}$—$4 \cdot 10^{-4}$ *молей/л* константа равновесия реакции составила $2{,}2 \cdot 10^{-15}$ *молей/л*. Метод разработан для анализа биологических жидкостей. Детали см. [12].

Определение мочевины [13]

Мочевину можно обнаружить и определить многими способами. Качественные определения являются неспецифическими. Из количественных методов особенно принято определение с уреазой[1] и ксантгидролом. Последнее определение может быть проведено гравиметрически или посредством определения азота по Кьельдалю, а также колориметрически, оксидиметрически и нефелометрически.

Реакция с уреазой дает двуокись углерода и аммиак (уравнение 1). Оба продукта реакции могут служить для установления содержания мочевины в пробе. Углекислоту CO_2 можно определить газометрически, NH_3 можно определять непосредственно (титровать в приемнике после дистилляции или после диффузии). Вместо титрования аммиак можно определять также колориметрически с реактивом Несслера после отделения посредством дистилляции, а также посредством адсорбции ионитами. Наиболее прост и не менее точен, чем названные выше методы, колориметрический метод определения реактивом Несслера непосредственно в гидролизной смеси после очистки ее от белка, если ставят соответствующие пустые опыты.

Принцип. Уреаза катализирует реакцию

$$H_2N—CO—NH_2 + H_2O \rightarrow CO_2 + 2NH_3. \qquad (1)$$

Реакция практически проходит полностью слева направо. Аммиак является величиной измеряемой. Он определяется колориметрически посредством реактива Несслера по экстинкции при 436 *ммк* или при длине волны, близкой к этой. Так как реакция Несслера очень чувствительна и окрашивание зависит от многих факторов, то результаты измерений относят к стандартному значению.

Уреаза не должна содержать аргиназы[2] и ионов аммония. Специфическая активность должна составлять по меньшей мере 3 единицы[3] на 1 *мг*.

[1] КФ 3.5.1.5.
[2] КФ 3.5.3.1.
[3] Единицей считается количество фермента, превращающее в 1 мин. 1 *мкмоль* субстрата.

Реактивы: 1) уреаза (50 *мг* белка на 1 *мл*): 250 *мг* уреазы суспендируют в 5 *мл* 50%-ной (о/о) смеси глицерин/бидистиллированная вода; 2) стандартный раствор сульфата аммония ($1{,}22 \cdot 10^{-3}$ *М*): 161 *мг* сульфата аммония растворяют в бидистиллированной воде и доводят объем до 1000 *мл*; 3) хлорная кислота (около 4% в/в): 3,3 *мл* 70%-ной хлорной кислоты (плотность — 1,67) разводят бидистиллированной водой до 100 *мл*; 4) реактив Несслера [1].

Растворы этого реактива имеются в продаже: перед употреблением смешивают 1 объемную часть раствора А (HgJ_2KJ) с 1 объемной частью раствора Б (NaOH). Состарившийся реактив Несслера часто приводит к помутнению, а таким образом, к неточностям измерения.

Взвесь уреазы и стандартный раствор сульфата аммония сохраняют закупоренными при 0—4°. Взвесь уреазы ежемесячно обновляют [2]. Растворы А и Б реактива Несслера хранятся 15 дней; смесь становится негодной приблизительно через 1 час.

Техника. Кровь, плазма или сыворотка и моча являются главными материалами исследования в клинической лаборатории. В сыворотке мочевина составляет около 50% веществ остаточного азота. С мочой выделяется 20—35 *г* в сутки.

Моча. Применяют 24-часовую мочу. Она может содержать значительные количества аммиака, которые слишком увеличивают значение пустого опыта пробы. Аммиак удаляют посредством катионита: пермутит на кончике шпателя прибавляют к 10 *мл* мочи, встряхивают, сливают с ионита. Мочу для опыта разводят 1 : 100 бидистиллированной водой.

Плазму или сыворотку берут по возможности из свежей крови (оксалатной или цитратной крови). Следует избегать фторидной крови, так как фторид ингибирует уреазу. В случае необходимости можно преодолеть ингибирующее действие фторида добавлением соли магния, лучше всего кофеин-магний-салицилата (1 *мг* на 1 *мл* крови).

Плазма и сыворотка имеют такое же содержание мочевины, как и цельная кровь. Если исследуют цельную кровь, то гемолизируют ее 7 объемами бидистиллированной воды; после ферментативной с уреазой реакции надосадочную жидкость, содержащую хлорную кислоту, нейтрализуют KOH до pH 7,3, оставляют в покое 10 мин. на ледяной бане, отфильтровывают $KClO_4$; берут 1 *мл* фильтрата, добавляют 4 *мл* воды и смесь применяют для колориметрического измерения. При вычислении следует учитывать изменения объема.

Уреазный метод определения мочевины нашел широкое применение, например для анализа тканей, продуктов питания, удобрений и питьевой воды [3].

[1] Приготовление реактива Несслера (растворы А и Б) см. В. С. Асатиани. Биохимическая фотометрия. М., Изд-во АН СССР, 1957, стр. 376.

[2] Водные растворы уреазы нестабильны. Поэтому рекомендуется применять уреазную бумагу. Приготовление и применение уреазной бумаги см. В. С. Асатиани. Биохимический анализ. Грузмедгиз, 1955, ч. II, стр. 333.

[3] Относительно различных уреазных методов определения мочевины см. В. С. Асатиани, там же, стр 329.

Ткани гомогенизируют. Образование мочевины под влиянием тканевой аргиназы устраняют тем, что в опыт вводят безбелковые пробы. Например, печень гомогенизируют с восьмикратным объемом 6%-ного (в/в) раствора хлорной кислоты, центрифугируют; 4 *мл* надосадочной жидкости смешивают с 1,75 *мл* приблизительно 1 *М* раствора K_3PO_4, после стояния в покое в течение 10 мин. на льду отфильтровывают $KClO_4$, для опыта берут 1 *мл* фильтрата.

Пищевые продукты в зависимости от состава экстрагируют водой, метанолом, этанолом или, например, бутанолом, либо непосредственно берут для опыта в виде взвеси в воде или буферном растворе, pH около 7 (например: цельное молоко, творог).

Ферментативная реакция. Для каждой пробы ставят «пустой опыт пробы» для учета содержания аммиака и в каждую серию опытов вводят значения стандартного раствора сульфата аммония и «пустой опыт реактивов».

В центрифужные пробирки емкостью 10 *мл* отмеривают пипеткой:

Проба	Пустой опыт пробы
1,0 *мл* пробы	1,0 *мл* пробы
0,1 *мл* уреазы (1)	—

Содержимое в пробирках смешивают опрокидыванием, дают постоять 15 мин. при комнатной температуре, затем приливают

3,0 *мл* хлорной кислоты (3)	3,0 *мл* хлорной кислоты 0,1 *мл* раствора уреазы (1)

Перемешивают маленькой стеклянной палочкой и центрифугируют 5—10 мин. при 3000 *g*. Надосадочную жидкость сливают в сухую пробирку. 0,2 *мл* этого раствора берут для колориметрического определения аммиака.

Колориметрическое измерение. Измерение ведут при 436 *ммк*. Толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 5,1 *мл*, комнатная температура.

В пробирки отмеривают пипеткой (в *мл*):

	Проба и пустой опыт пробы	Стандартный опыт	Пустой опыт реактивов
Бидистиллированная вода . . .	4,8	4,8	5,0
Надосадочная жидкость . . . . после очистки от белка	0,2	—	—
$(NH_4)_2SO_4$ (стандартный раствор 2)	—	0,2	—
Реактив Несслера (4)	0,1	0,1	0,1

Содержимое пробирок хорошо перемешивают покачиванием, часть растворов наливают в кюветы, в течение 5 мин. измеряют экстинкцию: стандартную пробу против пустого опыта реактивов ($E_{станд}$), испытуемую пробу — против пустого опыта пробы ($E_{пр}$).

При значении $E_{пр}$ выше 0,650 пробу разбавляют бидистиллированной водой 1 : 10 и повторяют определение.

Вычисление. Измеренное значение пробы ($E_{пр}$) относят к экстинкции стандартного опыта ($E_{станд}$); последнее отвечает 0,488 *мкмоля* аммиака на колориметрическую смесь опыта, что соответствует 0,244 *мкмолям* мочевины.

Так как из 4,1 *мл* ферментативной смеси опыта для колориметрического измерения вносят только 0,2 *мл*, то стандартный опыт соответствует $0{,}244 \cdot 20{,}5 = 5$ *мкмолей* в 1 *мл* пробы.

Таким образом,

$$\frac{E_{пр}}{E_{станд}} \cdot 5 = \textit{мкмолей} \text{ мочевины}/\textit{мл} \text{ пробы}$$

Это значение, умноженное на 60, дает *мкг* мочевины/*мл* пробы, умноженное же на 6 — содержание мочевины в пробе в *мг%*. При разведенных пробах (например, в моче) следует умножить еще на фактор разведения.

Пример. Определение мочевины в сыворотке. Анализировали 1 *мл* сыворотки и получили следующие значения экстинкций:

$$E_{станд} = 0{,}200; \quad E_{пр} = 0{,}230$$

$$\frac{E_{пр}}{E_{станд}} \cdot 5 = \frac{0{,}230}{0{,}200} \cdot 5 = 5{,}75 \ \textit{мкмолей} \text{ мочевины}/\textit{мл} \text{ сыворотки}$$

или $5{,}75 \cdot 6 = 34{,}5$ *мг %* мочевины в сыворотке.

Нормальные значения. Сыворотка: 13,8—39,8 *мг%*, в среднем 26,8 *мг%*; моча: 20—35 *г* в 24-часовой моче.

Уреаза реагирует с мочевиной абсолютно специфично.

Источники ошибок. Если уреаза потеряла свою эффективность, то мочевина разлагается не полностью. Состарившийся реактив Несслера приводит к помутнению окрашенного раствора, а вместе с этим к неточным и невоспроизводимым значениям. Рекомендуется стабилизированный реактив Несслера[1], который, однако, следует применять в течение 15 мин. (не позже!). Получаемое окрашивание стабильно по меньшей мере в течение часа.

Если материал не абсолютно свежий, легко образуется аммиак, что уменьшает точность измерения. Если аммиак образовался из мочевины пробы, то количество ее при анализе оказывается заниженным.

Креатинин мочи мешает проведению колориметрической реакции; эта помеха устраняется посредством измерения пустого опыта пробы.

Относительно новой, пока еще не проверенной модификации ферментного метода определения мочевины см. [23].

---

[1] См. В. С. Асатиани. Биохимический анализ, Грузмедгиз, ч. II, стр. 326.

Определение креатина [14]

Креатин, метилгуанидоуксусная кислота, встречается главным образом в мышцах различных живых существ: он составляют 0,3—0,5% веса сырой ткани. Кроме того, он встречается в мозге, в крови, в некоторых транссудатах и в щитовидной железе. Определения креатина в жидкостях организма и в мышце основывались до сих пор на прямых или косвенных колориметрических измерениях; эти способы неспецифичны и мало чувствительны.

Креатин может быть превращен АТФ и креатинфосфокиназой [1] (КФК) в креатин-фосфат. Эта специфическая реакция лежит в основе следующей прописи для анализа в сыворотке.

Принцип. Креатинфосфокиназа (КФК) катализирует реакцию

$$\text{креатин} + \text{АТФ} \rightleftarrows \text{креатинфосфат} + \text{АДФ}. \qquad (1)$$

АДФ фосфорилируется фосфоенолпируватом (ФЕП) с участием пируваткиназы [2] (ПК), образуется пируват:

$$\text{АДФ} + \text{ФЕП} \rightleftarrows \text{АТФ} + \text{пируват}. \qquad (2)$$

Пируват гидрируется посредством НАД-H_2 под влиянием лактатдегидрогеназы[3] (ЛДГ).

$$\text{Пируват} + \text{НАД-H} + H^+ \rightarrow \text{лактат} + \text{НАД}^+. \qquad (3)$$

Уменьшение количества НАД-H_2, измеренное по изменению экстинкции при 340 или 366 *ммк*, пропорционально количеству креатина.

Равновесие реакции сильно зависит от значения pH: в слабокислой области оно сдвинуто влево, в сторону образования креатина, в слабощелочной области — вправо в сторону образования креатинфосфата. Целесообразнее всего вести измерение при pH 9. Число превращений фермента относительно невелико (25 000 *молей* креатина на 1 *моль* фермента в минуту при 38°). Поэтому требуются относительно большие количества фермента (около 3 *мг* на смесь опыта) для того, чтобы реакция протекала более или менее быстро. Это особенно относится к измерениям в сыворотке, так как составные части сыворотки ингибируют фермент. До сих пор не удавалось их удалять.

ЛДГ и ПК должны быть свободны от креатинфосфокиназы; кроме того, все три фермента должны содержать самое большее по 10^{-3}% АТФ-азы[4] и миокиназы [5] (отнесенные к активности КФК); АТФ должен быть совершенно свободен от АДФ, а ФЕП — от пирувата.

[1] КФ 2.7.3.2.
[2] КФ 2.7.1.40.
[3] КФ 1.1 1.27 1.1.2.3.
[4] КФ 3.6.1.3. 3.6.1.8.
[5] КФ 2.7.4.3.

Р е а к т и в ы. Все реактивы изготовляют на свежеполученной бидистиллированной воде. Сосуды пропаривают для предотвращения роста микроорганизмов: 1) триэтаноламин + K_2CO_3 (0,43 *М* триэтаноламина + 0,54 *М* K_2CO_3): 2,0 *г* триэтаноламин-гидрохлорида и 1,9 *г* K_2CO_3 растворяют в воде и доводят объем до 25 *мл*; 2) фосфоенолпируват, хлорид магния ($1 \cdot 10^{-2}$ *М* ФЕП; 0,4 *М* $MgCl_2$), 14 *мг* ФЕП (трициклогексиламмониевая соль) и 300 *мг* $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ растворяют в 3,0 *мл* воды; 3) двууглекислый натрий (5% в/о): 5 *г* $NaHCO_3$ растворяют в воде и доводят объем до 100 *мл*; 4) восстановленный никотинамидадениндинуклеотид + аденозинтрифосфат ($5 \cdot 10^{-3}$ *М* β·НАД-H_2, $2{,}5 \cdot 10^{-2}$ *М* АТФ): 16 *мг* НАД-Н-Na_2 и 30 *мг* АТФ-$Na_2H_2 \cdot 3H_2O$ растворяют в 2 *мл* раствора двууглекислого натрия (3); 5) лактатдегидрогеназа + пируваткиназа[1] (ЛДГ ПК, по 1 *мг* белка на 1 *мл*): основную взвесь разводят соответственно 2,1 *М* раствором сульфата аммония и перемешивают; 6) креатинфосфокиназа КФК (60 *мг* белка на 1 *мл*)[2] : 60 *мг* белка фермента растворяют в 1 *мл* раствора $NaHCO_3$ (3), разведенного 1 : 10. Раствор ежедневно готовят свежим; 7) хлорная кислота (около 6% в/в): 5,2 *мл* 70%-ной хлорной кислоты разводят водой до 100 *мл*.

Все растворы и взвеси сохраняют закупоренными в холодильнике при 0—4°. Таким способом они сохраняются в течение по крайней мере нескольких недель. Раствор ФЕП + $MgCl_2$ и раствор НАД-H_2+ АТФ еженедельно готовят заново. Растворы 1 и 7 неограниченно устойчивы.

Т е х н и к а. *Подготовка исследуемого материала.* Применяют только свежую, свободную от гемолиза сыворотку. В центрифужную пробирку отмеривают пипеткой последовательно 5 *мл* ледяного раствора хлорной кислоты и 5 *мл* сыворотки, хорошо смешивают тонкой стеклянной палочкой и центрифугируют 15 мин. при 3000 *об/мин.*; 4 *мл* надосадочной жидкости смешивают с 1,1 *мл* раствора 1, отфильтровывают от осадка хлората после 15-минутного стояния на льду и из этого раствора, с pH равным приблизительно 9, после нагревания до 25°, берут в опыт 2,00 *мл*.

Постановка опыта. Измерение ведут при 340 или 366 *ммк*; толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 2,35 *мл*; комнатная температура.

Последовательно отмеривают пипеткой в кювету: 2,00 *мл* очищенной от белка пробы (нейтрализованной и забуференной), 0,15 *мл* раствора ФЕП + $MgCl_2$ (2); 0,10 *мл* раствора НАД-H_2+ АТФ (4); 0,05 *мл* взвеси ЛДГ + ПК (5). Хорошо смешивают тонкой стеклянной палочкой и следят за изменением экстинкции до установления постоянного значения (10—15 мин.). Затем измеряют экстинкцию E_1 и вносят 0,05 *мл* раствора КФК (6). Содержимое кювет перемешивают и через 50; 55; 60 мин. измеряют экстинкцию; посредством экстраполяции этих значений на значение в момент

[1] Приготовление см. G. B e i s e n h e r z et al. Z. N a t u r f o r s c h., 1953, 8b, 555.

[2] Приготовление см. S. K u b y et al. J. Biol. Chem., 1954, 209, 191.

добавления КФК определяют конечное значение экстинкции E_2; $E_1 - E_2 = \Delta E$

Вычисление. При указанных условиях согласно уравнениям реакция протекает стехиометрически. Разница экстинкции в 0,100 соответствует при толщине слоя в 1 *см*, согласно коэффициенту экстинкции НАД-H_2 при 340 *ммк* — 0,016 *мкмолям* НАД-H_2/*мл*; при 366 *ммк* — 0,030 *мкмолям* НАД-H_2/*мл* и, следовательно, стольким же *мкмолям* креатина. При объеме анализируемой жидкости в кювете 2,35 *мл* это будет при 340 *ммк* — 0,0376 *мкмолей* = 4,93 *мкг* креатина; при 366 *ммк* — 0,071 *мкмолей* = 9,3 *мкг* креатина.

Для того чтобы получить содержание креатина (в *мл*) исследованной сыворотки, эти значения следует умножить [на основании разведения при очистке от белка (1 + 1) и осаждения хлоратом (4 + 1,1), а также внесения 2 *мл* пробы] на 2 · (5,1/4) · (1/2) = = 1,275.

Таким образом для измерения при 340 *ммк*

$\Delta E \cdot 62{,}9$ = *мкг* креатина/*мл* сыворотки,

$\Delta E \cdot 6{,}29$ = *мг* % креатина в сыворотке;

при 366 *ммк*

$\Delta E \cdot 118{,}5$ = *мкг* креатина/*мл* сыворотки,

$\Delta E \cdot 11{,}85$ = *мг* % креатина в сыворотке.

Источники ошибок. Недостаточная чистота реактивов (см. стр. 353), особенно ферментов, приводит к завышенным значениям креатина. Если ФЕП содержит пируват, а АТФ — слишком много АДФ, то в самой реакции креатина израсходуется слишком много НАД-H_2. В таком случае до добавления КФК следует еще добавить НАД-H_2. Слишком малая активность КФК или малое ее количество приводит к слишком низким значениям креатина; при употреблении 1,5 *мг* фермента обнаруживают только 80% введенного креатина. КФК инактивируется при pH 7, поэтому следует избегать растворов, сильно разведенных дистиллированной водой. Удаления пирувата из пробы ионитами до ферментативного определения не требуется, оно легко приводит к потерям креатина.

Креатинфосфокиназа специфична для креатина и аденозин-5'-трифосфата. Креатинин, аргинин, цитрулин, уреидосукцинат, канаванин и гликоциамидин не влияют на определение. Гликоциамин также реагирует с КФК, но только со скоростью в 40 раз меньшей, чем креатин.

Особенности при анализе тканей. При гомогенате следует обращать внимание на то, чтобы фильтрат после очистки от белка был свободен от хлората и pH установлен на 9. Гомогенаты, например, из скелетных мышц мышей, содержат столько креатина (около 0,6‰), что можно анализировать только 0,5%-ный гомогенат. Для этого количество раствора триэтаноламина K_2CO_3 (1), приведенное для сыворотки, будет недостаточно для установления pH равным 9. Применяют большее количество раствора и учитывают его при вычисле-

нии. Точность метода 2%. Недавно предложены новые ферментные методы определения креатина, пока еще не проверенные другими лабораториями (см. [24, 25]).

Определение мочевой кислоты [15]

Принцип. Фермент уриказа [1] катализирует реакцию

$$\text{Мочевая кислота} + O_2 + 2H_2O \rightarrow \text{Аллантоин} + H_2O_2 + CO_2. \quad (1)$$

Во время реакции экстинкция мочевой кислоты при 293 *ммк* уменьшается пропорционально концентрации мочевой кислоты.

Реактивы: 1) буферный раствор глицина (0,07 *М*, pH 9,3): 25 *г* глицина растворяют в 200 *мл* дистиллированной воды, свободной от CO_2, добавляют 110 *мл* 1 н. раствора NaOH; 2) уриказа (200—300 *ед/мл*) [2]: содержимое одной ампулы уриказы (75 единиц) растворяют в 0,25 *мл* буферного раствора (1) или применяют неразведенную взвесь фермента.

Раствор фермента сохраняется в холодильнике по меньшей мере 14 дней. Буферный раствор, если он предохранен от роста микроорганизмов, сохраняется несколько месяцев.

Техника. *Подготовка исследуемого материала.* Плазму или сыворотку разводят буферным раствором (1) 1 : 40 (до содержания 0,5—5,0 *мкг* мочевой кислоты в 1 *мл*). Мочу разводят буферным раствором (1) 1 : 400 (до содержания 2—4 *мкг* мочевой кислоты в 1 *мл*). Если моча содержит обильный осадок, и следовательно, много мочевой кислоты, то ее разводят 1 : 10^3. Если моча почти бесцветна, ее разводят 1 : 100. Дальнейшая подготовка материала не требуется.

Постановка опыта. Измерение ведут при 293 *ммк* в кварцевых или стеклянных кюветах, толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 3,01 *мл*, комнатная температура. Измерение ведут против сравнительной кюветы. Фермент как белок сам абсорбирует при 293 *ммк*. Хотя этой экстинкцией фермента E_F большей частью можно пренебречь, но все же следовало бы ее определять для каждого препарата фермента.

В кювету отмеряют пипеткой: 2,99 *мл* буферного раствора (1) и 0,01 *мл* раствора уриказы или взвеси [3] (2) (2—3 единицы).

Экстинкцию *E* измеряют против сравнительной кюветы с 3 *мл* буферного раствора (1).

Ввиду большей частью очень высокой экстинкции пробы (обусловленной белком и другими веществами, абсорбирующими при

---

[1] КФ 1.7.3.3.

[2] 1 единица — это количество фермента, которое при pH 9,3 из 5 *мкг* мочевой кислоты расщепляет 1 *мкг/мин*. При длине волны в 293 *ммк* одна единица уриказы вызывает в 3 *мл* смеси опыта при толщине слоя 1 *см* изменение экстинкции, равное 0,025 в минуту.

[3] Экстинкция количества фермента, внесенного в опыт, должна быть небольшой по сравнению с изменением экстинкции, полученной при измерении.

293 *ммк*) измеряют против сравнительной кюветы, содержащей меньше жидкости, чем кювета опыта.

Последовательно отмеривают пипеткой: в сравнительную кювету — 2,40 *мл* разведенной сыворотки или плазмы, 0,60 *мл* буферного раствора (1) или 3,00 *мл* дистиллированной воды для измерения мочевой кислоты в моче; в кювету опыта — 3,00 *мл* разведенной пробы. Экстинкцию E_1 измеряют против сравнительной кюветы [1]. В кювету опыта вносят, помешивая, 0,01 *мл* раствора уриказы или взвеси (2) (2—3 единицы). После прекращения реакции (10—20 мин.) измеряют экстинкцию E_2; $E_1 + E_E - E_2 = \Delta E$ входит в вычисление.

Если при высоком содержании мочевой кислоты пробы E_2 получается отрицательной, то измеряют экстинкцию сравнительной кюветы против экстинкции кюветы опыта. Тогда

$$\Delta E = E_1 + E_E + E_2.$$

Если шкалы измерительного прибора не хватает, то измеряют экстинкцию E_3 — кюветы опыта против сравнительной ΔE_v сравнительной кюветы с раствором пробы против сравнительной кюветы с водой. Тогда

$$\Delta E = E_1 - E_E - E_3 + \Delta E_v.$$

Вычисление. При толщине слоя 1 *см* превращение 1 *мкг* мочевой кислоты в 1 *мл* соответствует уменьшению экстинкции в $\Delta E = 0{,}075$ при длине волны 293 *ммк*. Стало быть:

$$\frac{\Delta E}{0{,}075} = \text{мкг мочевой кислоты/мл смеси опыта.}$$

Вследствие предварительного разведения пробы (плазма или сыворотка 1 : 40, моча 1 : 400) получают:

$$\frac{\Delta E}{0{,}075} \cdot 40 = \text{мкг мочевой кислоты/мл сыворотки или плазмы.}$$

$$\frac{\Delta E}{0{,}075} \cdot 400 = \text{мкг мочевой кислоты/мл мочи.}$$

Умножение этих значений на 0,1 дает обычные для клинических лабораторий *мг%*.

Источники ошибок. Определение не нарушается никакими веществами, встречающимися в пробе. Сравнительную оценку точности ферментного и колориметрического методов см. [26].

---

[1] Вообще определяют значение экстинкции между 0,500 и 0,100. При более низких или высоких экстинкциях соответственно варьирует объем пробы в сравнительной кювете.

Определение аденозина [16]

Количественное ферментативное определение аденозина посредством аденозиндезаминазы [1] из слизистой оболочки кишки было принято повсюду вследствие его высокой специфичности.

Принцип. Аденозиндезаминаза катализирует дезаминирование аденозина в инозин:

$$\text{аденозин} + H_2O \rightleftharpoons \text{инозин} + NH_3.$$

Равновесие лежит далеко на правой стороне. Реакция проходит полностью в буферном растворе фосфата (pH 7,4) при комнатной температуре в течение нескольких минут. Так как аденозин максимально абсорбирует свет при 265 *ммк*, а инозин — при 247 *ммк*, то величиной измерения является уменьшение экстинкции при 265 *ммк*.

Если опыт ведут в буферном растворе фосфата, то достаточно сырого фермента (около 5—10 единиц на 1 *мг*) [2]. Он может содержать фосфатазы (в присутствии фосфата ингибирующие фосфатазы [3] полностью заторможены). В других случаях специфическая активность должна составлять $>$ 100 *ед/мг*, и препарат не должен содержать больше 0,01% фосфатазы (в отношении специфической активности дезаминазы).

Реактивы (приблизительно для 20 определений): 1) буферный раствор фосфата (0,05 *М*, pH 7,4): 19 *мл* раствора 680 *мг* KH_2PO_4 в 100 *мл* бидистиллированной воды смешивают с 81 *мл* раствора 870 *мг* K_2HPO_4 в 100 *мл* бидистиллированной воды); 2) аденозиндезаминаза (100 *мкг* белка на 1 *мл*): взвесь фермента разводят соответственно 2,5 *М* раствором сульфата аммония; 3) хлорная кислота (1 *М*): 9 *мл* 70%-ной кислоты разводят бидистиллированной водой до 100 *мл*; 4) карбонат калия (около 5 *М*): 69 *г* K_2CO_3 растворяют в бидистиллированной воде, объем доводят до 100 *мл*.

Раствор фермента и буферный раствор сохраняют закупоренными при 0—4°. Оба сохраняются в течение нескольких месяцев, до обнаружения роста микроорганизмов.

Техника. *Подготовка исследуемого материала*. Из проб с очень незначительным (менее 10 *мкг* в 1 *мл*) содержанием белка можно не осаждать его. Сюда относятся гидролизаты нуклеиновых кислот, смеси нуклеотидов и нуклеозидов, очищенный аденозин и препараты, в которых аденозин должен быть определен как загрязнение. Большей частью следует измерять против пустого опыта (с пробой без фермента), чтобы компенсировать экстинкцию других дериватов пурина и пиримидина.

В пробах с большим содержанием белка (например, концентраты дрожжей) белки должны быть осаждены хлорной кислотой. Три-

---

[1] КФ 3.5.4.4.

[2] 1 единица — это количество фермента, которое в 1 мин. превращает 1 *мкмоль* субстрата.

[3] КФ 3.1.3.1. см. КФ 3.1.3.2.

хлоруксусная кислота непригодна для этих целей, так как она сильно абсорбирует в УФ-лучах.

Отмеряют пипеткой в центрифужную пробирку емкостью 10 *мл*: 1 объем (1 *мл*) раствора хлорной кислоты (3) и 1 объем (1 *мл*) пробы, хорошо смешивают тонкой стеклянной палочкой, 3 мин. центрифугируют (около 3000 *g*), нейтрализуют добавлением около 0,05 *мл* раствора K_2CO_3 (4) на 1 *мл* надосадочной жидкости, 10 мин. отстаивают на льду, фильтруют, берут фильтрата 0,05 *мл* для опыта.

Постановка опыта. Предварительное замечание. Если проба содержит много других нуклеозидов или нуклеотидов, высокая экстинкция которых при 265 *ммк* затрудняет точное определение аденозина, то следует определить в предварительном опыте приблизительное изменение экстинкции, обусловленное аденозином.

Тогда измерение ведут в основном опыте против пустого опыта, который содержит столько пробы, что компенсируется минимум $^3/_4$ экстинкции, вызванной не аденозином при 265 *ммк*.

Измерение ведут при 265 *ммк* в кварцевых кюветах. Толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 3 *мл*, комнатная температура. Измерение ведут против пустого опыта с буферным раствором (1) или против буферного раствора + проба (см. выше).

Последовательно отмеривают пипеткой в кюветы: 2,48 *мл* буферного раствора (1) и 0,50 *мл* пробы, смешивают, измеряют начальную экстинкцию E_1 (должно быть не больше, чем около 0,500). Затем вносят, помешивая уплощенной внизу стеклянной или пластмассовой палочкой, 0,02 *мл* взвеси фермента (2) и каждую минуту измеряют экстинкцию; конечное значение E_2 обычно достигается через 5—10 мин.

Для определения абсорбции света ферментным белком снова вносят 0,02 *мл* взвеси фермента (2), перемешивают и измеряют экстинкцию E_3 (необходимо только для сырых препаратов фермента со специфической активностью < 100 *ед/мг*). $E_3 - E_2 = \Delta E_E$, которую вычитают из E_2; $\Delta E = E_1 - (E_2 - \Delta E_E)$ входит в вычисление.

Вычисление. $\Delta E = E_1 - (E_2 - \Delta E_E)$ пропорционально количеству аденозина. Калибровочные кривые (см. выше) линейны и пересекают нулевую точку координат. При пользовании абсолютно чистым аденозином для 10 *мкг* аденозина в 1 *мл* содержимого кюветы разница экстинкции составляет $\Delta E = 0{,}303$ вместо значения 0,263, указываемого Калькаром [1]. Таким образом, для 1 *мкг* аденозина в объеме анализируемой жидкости (в 3 *мл*) $\Delta E = 0{,}0101$. Тогда

$$\frac{\Delta E}{0{,}0101} = \text{мкг аденозина/ } 0{,}5 \text{ мл пробы.}$$

Для перечисления на *мкг* аденозина/*мл* пробы эту величину следует разделить на объем пробы, примененный для опыта.

Если из пробы были осаждены белки, то следует, кроме того, помножить на фактор разведения (2 + *мл* раствора K_2CO_3).

[1] H. Kalckar. J. Biol. Chem., 1947, 167, 445.

Если выбирают область измерения фотометрической шкалы, в которой $\Delta E = 0{,}010$ может быть достаточно точно измерена, то можно определить концентрации порядка 2 *мкг* аденозина на 1 *мл* пробы (предел чувствительности метода).

Пример. Гидролизат нуклеиновой кислоты разведен бидистиллированной водой 1 : 30; для опыта применяют 0,5 *мл*. Измерение ведут с сырым препаратом фермента. Спектрофотометр Бекмана.

В предварительном опыте было найдено: $E_1 \approx 1{,}5$; $E_2 \approx 1{,}3$. Экстинкция, обусловленная не аденозином, при 265 *ммк* равна 1,3. В основном опыте к пустому опыту было прибавлено:

$$\frac{3}{4} \cdot 1{,}3 \cdot \frac{0{,}5^1}{1{,}5} \approx 0{,}33 \text{ мл пробы.}$$

Против этого пустого опыта измеряли (время реакции 5 мин.):

$$E_1 = 0{,}503;\ E_2 = 0{,}319;\ E_3 = 0{,}325;\ \Delta E_E = E_3 - E_2 = 0{,}006;$$

$$E_2 - \Delta E_E = 0{,}319 - 0{,}006 = 0{,}313;\quad \Delta E = 0{,}503 - 0{,}313 = 0{,}190,$$

$$\frac{0{,}190}{0{,}0101} \cdot \frac{1}{0{,}5} \cdot 30 = 1130 \text{ мкг аденозина/мл пробы,}$$

где 0,5 — объем пробы в опытной смеси, *мл*, 30 — фактор разведения.

Другие определения. Если сырые препараты аденозиндезаминазы содержат щелочные фосфатазы и пирофосфатазу или эти ферменты добавляют к системе опыта, то определением могут быть охвачены все соединения, содержащие аденозинфосфат (например, А-2′-МФ, А-3′-МФ, А-5′-МФ, КоА, НАД, НАДФ). Посредством ступенчатого добавления фосфатаз можно провести дифференцирование между аденозином, его фосфатами и их соединениями.

Источники ошибок. 1. Лишь в немногих случаях фильтраты тканей содержат вещества, ингибирующие аденозиндезаминазы. Если дезаминирование происходит плохо или совсем не происходит, то добавляют сначала больше фермента. Если это не дает эффекта, то испытывают функциональную способность систем опыта путем добавления около 5 *мкг* чистого аденозина. Если через несколько минут весь добавленный аденозин снова обнаружится, то значит в смеси ингибирующих веществ не имеется. В противном случае пробы надо предварительно очистить ионитом, например Амберлит I*R* 4B или Дауэкс 1 × 10 (см. [16])[2].

2. Помутнения любого рода вызывают высокую экстинкцию пробы при 265 *ммк*, поэтому их следует избегать. Они могут быть вызваны также осадками, образующимися при взаимодействии компонентов пробы (например, Mg^{2+}) с буферным раствором фосфата.

---

[1] $\frac{0{,}5}{1{,}5}$ = пересчет E_1 в предварительном опыте (1,5) на предполагаемое значение $E_1 \approx 0{,}5$ в основном опыте.

[2] Характеристику ионитов см. Г. Осборн. Синтетические ионообменники, изд-во «Мир», 1964.

Фермент дезаминирует аденозин в инозин и 2,6-диаминорибофуранозилпурин в гуанозин [1]. Аденозиндезаминаза не реагирует с дезоксирибоаденозином, рибогуанозином, рибоцитидином, А-5'-МФ, А-3'-МФ или А-2'-МФ, а также с АТФ и аденином. Точность метода 3%.

Определение гуанозина [17]

Т е х н и к а. *Исследуемый материал* — водный раствор гуанозина. Описанный здесь метод применялся только для анализа чистых водных растворов гуанозина.

Метод применялся только с чистыми водными растворами гуанозина.

П р и н ц и п. Нуклеозидфосфорилаза катализирует реакцию

$$\text{гуанозин} + \text{фосфат} \rightleftharpoons \text{гуанин} + \text{рибоза-1-фосфат}. \quad (1)$$

В присутствии избыточного фосфата реакция протекает полностью слева направо. Гуанин далее превращается:

$$\text{гуанин} + H_2O \rightarrow \text{ксантин} + NH_3; \quad (2)$$

$$\text{ксантин} + H_2O + O_2 \rightarrow \text{мочевая кислота} + H_2O_2; \quad (3)$$

$$\text{мочевая кислота} + O_2 + 2H_2O \rightarrow \text{аллантоин} + H_2O_2 + CO_2. \quad (4)$$

Реакции (2) — (4) катализируются соответственно гуаназой [2], ксантиноксидазой [3] и уриказой [4]. Образование в реакции мочевой кислоты повышает экстинкцию при 293 *ммк*. Это повышение снова исчезает с прибавлением уриказы. Измеряют уменьшение экстинкции при 293 *ммк*, происходящее в результате реакции (4).

Препараты ферментов, полученных по методам, указанным в сносках на стр. 361, позволяют проводить определение гуанозина.

Р е а к т и в ы: 1) фосфатный буферный раствор (0,05 *М*, pH 7,9): а) 27,2 *г* KH_2PO_4 растворяют в бидистиллированной воде, объем доводят до 1000 *мл*, б) 53,6 *г* $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ растворяют в бидистиллированной воде и доливают до 1000 *мл*. Затем 7,0 *мл* раствора *а* смешивают с 93,0 *мл* раствора *б* и доливают бидистиллированной водой до 400 *мл*; 2) трис-буферный раствор (0,05 *М*, pH 7,9): 1,21 *г* трис-оксиметиламинометана растворяют в 50 *мл* бидистиллированной воды, добавляют 29,7 *мл* 0,2н. раствора HCl и доливают бидистиллированной водой до 200 *мл*, проверяют значение pH (стеклянный электрод); 3) этилендиаминтетраацетат (0,01 *М*): 0,372 *г* ЭДТА-$Na_2H_2 \cdot 2H_2O$ растворяют в бидистиллированной воде, объем раствора доводят до 100 *мл*; 4) стандартный раствор гуанозина ($5 \cdot 10^{-3}$ *М*): 28,3 *мг* гуанозина растворяют в 20 *мл* бидистиллирован-

[1] Здесь продукт реакции инозин можно отличить от гуанозина посредством ферментативного определения с нуклеозидфосфорилазой и ксантиноксидазой.
[2] КФ 3.5.4.3.
[3] КФ 1.2.3.2.
[4] КФ 1.7.3.3.

ной воды при нагревании; 5) нуклеозидфосфорилаза 129 000 единиц [1] на 1 *мл*: препарат соответственно разводят дистиллированной водой [2]; 6) ксантиноксидаза — КФ 1.2.3.2 (14 000 *ед/мл*): продажный препарат соответственно разводят дистиллированной водой [3]; 7) гуаназа — КФ 3.5.4.3 (14 000 *ед/мл*): продажный препарат соответственно разводят дистиллированной водой [4]; 8) уриказа 42 000 *ед/мл*; КФ 1.7.3.3 [5]: растворяют или разводят соответственно дистиллированной водой [6].

Растворы ферментов сохраняют замороженными при — 17°. При этой температуре они сохраняются годами. При повторном оттаивании и замораживании наблюдаются потери активности. Все остальные реактивы хранят при 0° и возобновляют каждые 3 месяца.

Техника. *Исследуемый материал* — водный раствор гуанозина.

Постановка опыта. Все реактивы перед определением приводят к комнатной температуре. Растворам ферментов дают оттаять и оставляют стоять в ледяной бане.

Измерение ведут при 293 *ммк*, толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 3,0 *мл*. Измерение ведут против сравнительной кюветы.

Отмеряют пипеткой в кюветы: в опытную — 2,400 *мл* буферного раствора триса (2), 0,300 *мл* буферного раствора фосфата (1), 0,030 *мл* раствора ЭДТА (3), 0,020 *мл* пробы (содержит около 0,2 *мкмолей* гуанозина) или стандартный раствор гуанозина (4), 0,165 *мл* бидистиллированной воды, 0,035 *мл* (около 500 единиц) раствора ксантиноксидазы (6), 0,005 *мл* (около 500 единиц) раствора нуклеозидфосфорилазы (5), 0,035 *мл* (около 500 единиц) раствора гуаназы (7); в сравнительную кювету — 2,400 *мл* буферного раствора трис (2), 0,300 *мл* буферного раствора фосфата (1), 0,030 *мл* раствора ЭДТА (3), 0,270 *мл* бидистиллированной воды. Смешивают, осторожно продувают воздух через растворы, каждые 5 мин. измеряют экстинкцию и записывают начальное значение E_1. Затем в каждую кювету опыта вносят: 0,010 *мл* (около 500 единиц) раствора уриказы (8), перемешивают и следят за экстинкцией. Константное конечное значение E_2. Экстинкцию раствора уриказы (8) следует определять отдельно при 293 *ммк*; для этого вливают в две кюветы (толщина слоя 1 *см*) содержимое сравнительной кюветы; в одну кювету вносят 0,01 *мл*

---

1 Определение и измерение как для нуклеотидфосфорилазы, но с 1,5 *мкмолями* гуанозина в качестве субстрата и дополнительно нуклеотидфосфорилазой в избытке.

2 V. Price et al. В кн. Colowick S. a. Kaplan N. Methods in Enzymology, Ac. Press. N. Y., B. II, p. 448.

3 H. Klenow a. R. Emberland. Arch. Bioch. Bioph., 1955, 58, 276.

4 L. Shuster. В кн. Colowick S. a. Kaplan N., p. 480.

5 Единицей считается количество фермента, которое понижает экстинкцию в 3 *мл* смеси опыта (0,05 *М* буферного раствора триса, pH 7,9; толщина слоя 1 *см*) с 0,15 *мкмолями* мочевой кислоты при 20° при 293 *ммк* на 0,001 за 1 мин. (спектрофотометр Бекмана).

6 H. Mahler et al. J. Biol. Chem., 1955, 216, 625.

раствора уриказы (8), перемешивают и измеряют повышение экстинкции E_y против кюветы, свободной от фермента, E_y очень незначительно и для каждого нового препарата уриказы его следует определять только один раз.

Вычисление.

$$\frac{(E_1 - E_2 - E_y) \cdot 3}{12{,}15} = \textit{мкмолям гуанозина/мл опытной смеси},$$

где E_1 — экстинкции до добавления раствора уриказы, E_2 — экстинкции после добавления раствора уриказы, E_y — экстинкции раствора уриказы, 3 — объем анализируемой жидкости, *мл*, 12,15— коэффициент экстинкции мочевой кислоты при 293 *ммк* (*см²/мкмоль*). Точность метода при анализе чистых растворов 1%.

Определение гипоксантина и ксантина [18]

Принцип. Ксантиноксидаза [1] окисляет гипоксантин и ксантин в мочевую кислоту:

$$\text{гипоксантин} + H_2O + O_2 \rightarrow \text{ксантин} + H_2O_2; \quad (1а)$$

$$\text{ксантин} + H_2O + O_2 \rightarrow \text{мочевая кислота} + H_2O_2 \quad (1б)$$

Образовавшаяся мочевая кислота расщепляется уриказой [2]:

$$\text{мочевая кислота} + O_2 + 2H_2O \rightarrow \text{аллантоин} + H_2O_2 + CO_2. \quad (2)$$

Реакция расщепления (2) связана с исчезновением абсорбции мочевой кислоты при 293 *ммк*. Снижение экстинкции при этой длине волны протекает пропорционально содержанию гипоксантина + ксантин в опытной смеси. Если исследуемый материал содержит мочевую кислоту, то необходима предварительная инкубация с уриказой. До начала определения гипоксантина и ксантина фермент должен быть полностью разрушен (подщелачивание раствора до pH 11). Гипоксантин может быть определен наряду с ксантином, если измеряют изменения экстинкции при двух длинах волны: уменьшение экстинкции при 250 *ммк* после добавления ксантиноксидазы пропорционально количеству гипоксантина; уменьшение же экстинкции при 293 *ммк* после добавления уриказы дает сумму гипоксантин + ксантин. Однако кровь и моча часто так сильно абсорбируют свет при 250 *ммк*, что определение этой разницы становится невозможным.

Чистота имеющихся в продаже ферментных препаратов [3] позволяет использовать их при определении гипоксантина и ксантина описываемым методом.

[1] КФ 1.2.3.2.
[2] КФ 1.7.3.3.
[3] Относительно получения их см. сноски 3 и 6 на стр. 361.

Реактивы: 1) глициновый буферный раствор (0,6 *М*; рН 9,3): 4,48 *г* глицина растворяют в 40 *мл* дистиллированной воды, добавляют 19,7 *мл* 1н. раствора NaOH и доливают дистиллированной водой до 100 *мл*. Проверяют значение рН (стеклянный электрод); 2) буферный раствор глицилглицина (0,6 *М*, рН 8,2): 3,17 *г* глицилглицина растворяют в 5 *мл* 1н. раствора NaOH, добавляют 20 *мл* дистиллированной воды, проверяют рН (стеклянный электрод) и доливают дистиллированной водой до 40 *мл*; 3) трихлоруксусная кислота (10% в/о): 10 *г* трихлоруксусной кислоты растворяют в дистиллированной воде и доводят объем раствора до 100 *мл*; 4) стандартный раствор гипоксантина ($2\cdot10^{-3}$ *М*): 27,2 *мг* гипоксантина растворяют в 100 *мл* 0,01н. раствора NaOH; 5) стандартный раствор ксантина ($2\cdot10^{-3}$ *М*): 30,4 *мг* ксантина растворяют в 100 *мл* 0,01н. раствора NaOH; 6) стандартный раствор мочевой кислоты ($2\cdot10^{-3}$ *М*): 33,6 *мг* мочевой кислоты растворяют в 1 *мл* 0,01н. раствора NaOH и объем доводят до 100 *мл*; 7) ксантиноксидаза[1]: полученный из фосфатного геля элюат или продажный препарат разбавляют 0,2 *М* фосфатным буферным раствором (рН 7,4) так, чтобы 0,01 *мл* раствора фермента вызывало бы повышение экстинкции при 293 *ммк* на 0,010 в минуту, когда его вносят в смесь из 0,03 *мл* стандартного раствора гипоксантина (4) и 2,97 *мл* 0,06 *М* буферного глицилглицинового раствора (2), разведенный бидистиллированной водой 1 : 10; 8) уриказа: содержимое ампулы препарата[2] растворяют в 0,25 *мл* 0,06 *М* буферного раствора глицина (1), разведенный 1 : 10 дистиллированной водой. Или же раствор фермента разводят при необходимости 0,06 *М* буферным раствором глицина настолько, чтобы 0,01 *мл* раствора фермента вызывала бы уменьшение экстинкции при 293 *ммк* на 0,005—0,010 в минуту, если его добавляют к смеси из 0,03 *мл* стандартного раствора мочевой кислоты (6) и 2,97 *мл* 0,06 *М* буферного раствора глицина.

Буферные растворы хранят при 4° и добавляют к ним 0,5 *мл* хлороформа на 100 *мл*. Ксантиноксидазу хранят замороженной небольшими порциями, соответствующими ежедневному употреблению. Раствор во время серии опытов хранят при 4°. Раствор уриказы сохраняют при 4°.

Техника. *Подготовка исследуемого материала.* В короткую пробирку, содержащую 1—2 капли раствора гепарина (39 *мг* гепарина/*мл* дистиллированной воды = 5000 интернациональных единиц/*мл*), дают натечь из вены 4—5 *мл* крови. Тотчас же осаждают белки. Для этого 2 *мл* анализируемого материала насасывают шприцем для инъекции и тонкой, но сильной струей вливают в 2 *мл* 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Центрифугируют, смешивают 2 *мл* надосадочной жидкости с 3 *мл* дистиллированной воды и 0,2 *мл* 1,6н. раствора NaOH. Смесь анализируют.

---

1 Получение см. сноску 3 на стр. 361.

2 Получение см. сноску 6 на стр. 361.

Если анализируют плазму, то тотчас же центрифугируют, так как распад АТФ, содержащегося в клетках крови, который начинается быстро после взятия крови, приводит к образованию гипоксантина внутри и вне клеток крови. Сыворотку анализировать нельзя.

Осаждать белки из мочи нет необходимости. В зависимости от диуреза мочу разводят в различной степени: при диурезе в 1 *мл/мин* 0,3 *мл* мочи смешивают с 4 *мл* дистиллированной воды. При менее значительном диурезе берут меньше мочи, при сильном диурезе — больше. Анализируют разведенную мочу.

Предварительная ферментативная реакция. Отмеряют пипеткой в мерную колбу емкостью 10 *мл* очищенную от белков смесь или разведенную мочу (5 *мл*) и добавляют около 0,3—0,4 *мл* буферного раствора глицина (1) до pH 9,3 (индикаторная бумага). Затем вносят 0,01—0,02 *мл* раствора уриказы (8), перемешивают и дают стоять не менее 1 часа при комнатной температуре.

Инактивируют уриказу добавлением 1,0 *мл* приблизительно 1,6н. раствора NaOH; выдерживают 15 мин., нейтрализуют 1 *мл* 1,6н. раствора HCl, доводят значение pH до 8,2 прибавлением 0,6 *мл* буферного раствора глицилглицина (2) (индикаторная бумага) и вносят 0,02 *мл* раствора ксантиноксидазы; смесь перемешивают, дают стоять 2 часа при комнатной температуре, приводят значение pH к 9,0 (индикаторная бумага) добавлением 0,5—0,10 *мл* 1,6н. раствора NaOH; затем вливают 1,0 *мл* буферного раствора глицина (1); теперь значение pH должно быть 9,3 (контролируют индикаторной бумагой). Объем смеси доводят до 10 *мл*, доливая дистиллированную воду.

Определение мочевой кислоты. Измерение ведут при 293 *ммк*; толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 3,01 *мл*; измерение ведут против сравнительной кюветы.

Отмеряют пипеткой в кювету опыта и в сравнительную кювету 3,0 *мл* смеси предварительной ферментативной реакции. Для сравнительной кюветы устанавливают на спектрофотометре экстинкцию (293 *ммк*) на 0,1; 0,2 или 0,3, сообразно с величиной уменьшения, которое ожидают в кювете опыта после добавления уриказы.

Обычно бывает достаточно установить экстинкцию на 0,1. Измеряют экстинкцию E_1 кюветы опыта, вносят в нее отогнутой книзу пластмассовой палочкой каплю (0,01 *мл*) раствора уриказы (8), перемешивают. В течение 60—80 сек. экстинкцию измеряют 4—5 раз, значения наносят против времени; экстинкция, экстраполированная на нулевое время, — E_2.

Вычисление. $\frac{\Delta E \cdot 10}{12{,}5}$ *мкмолей* (гипоксантин + ксантин, в опытной смеси для предварительной ферментативной реакции, где $\Delta E = E_1 - E_2$, 10 — объем анализируемого раствора после предварительной ферментативной реакции, *мл*, 12,5—коэффициент экстинкции мочевой кислоты при 293 *ммк* (*см²/мкмоль*).

Для того чтобы получить *мкмоли* гипоксантин + ксантин на

1 *мл* исследуемого материала, следует умножить при применении 0,3 *мл* мочи на $\frac{10}{3}$. Для исследуемого материала, который должен быть освобожден от белка по описанному здесь методу, значение, вычисленное, согласно вышеприведенной формуле, сразу же соответствует содержанию суммы гипоксантин + ксантин в 1 *мл* анализируемого материала.

Нормальные значения. Плазма содержит от 5 до 10 *мкмолей* смеси гипоксантин + ксантин на 1000 *мл* или от 0,1 до 0,3 *мг* на 100 *мл*. Если не обрабатывать кровь дальше тотчас после взятия, то значения повысятся в 50—100 раз (см. «Исследуемый материал»).

В моче концентрация гипоксантин + ксантин составляет от $^1/_{10}$ до $^1/_{20}$ концентрации мочевой кислоты. Содержание гипоксантина + + ксантин не изменяется в течение двух недель, если пробу мочи сохраняют при 4°.

Специфичность метода. Уриказа специфична для мочевой кислоты.

В противоположность этому ксантиноксидаза катализирует окисление по меньшей мере 30 альдегидов, кетонов и пуринов.

Гипоксантин и ксантин могут, таким образом, быть определены специфическим способом только в том случае, если измеряют мочевую кислоту, образованную из обоих пуринов под действием ксантиноксидазы.

П р и л о ж е н и е. *Получение ксантиноксидазы.* Свежее парное молоко обезжиривают, пока оно еще теплее 25°. Сливки сохраняют в течение ночи при 0°, на следующий день сбивают в масло при 15°. Пахтанье соединяют с 0,6 объема 0,2 *M* раствора Na_2HPO_4 и добавляют к нему трипсин из расчета 600 *мг* трипсина на 1000 *мл* жидкости, 3 часа отстаивают при 35°. Медленно вносят, помешивая, 0,5 объема насыщенного водой *н*-бутанола. Смесь центрифугируют 15 мин. при 10 000 *g*, водную фазу отсасывают и добавляют к ней на каждые 100 *мл* 47 *мл* насыщенного при 0° раствора $(NH_4)_2SO_4$. Через 15 мин. центрифугируют, высолившийся белок выбрасывают. Затем на каждые 100 *мл* раствора вносят 47 *мл* насыщенного при 0° $(NH_4)_2SO_4$, через час центрифугируют, раствор выбрасывают, выделившийся белок растворяют в дистиллированной воде до концентрации 8 *мг* белка в 1 *мл*. На каждый 1 *мл* раствора добавляют 1,2 *мл* $CaHPO_4$ геля[1] (16 *мг* сухого вещества на 1 *мл*), центрифугируют, три раза элюируют гель, каждый раз 1 *мл* 0,2 *M* буферного раствора фосфата (pH 7,4) и один раз 1 *мл* 0,3 *M* раствора K_2HPO_4

---

[1] Получение см. D. K e i l i n a. E. H a r t r e e. Proc. Roy. Soc. (London), ser. 13, 1939, 124, 397. К 1600 *мл* раствора, в 1 *л* которого содержится 132 *г* $CaCl_2 \cdot 6H_2O$, приливают 150 *мл* раствора, содержащего в 1 *л* 152 *г* $Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$. pH доводят добавлением 10% HCl до 7,4. Выпавший осадок промывают 4 раза 20 объемами воды, воду сливают, промывают еще раз 40 объемами бидистиллированной воды и центрифугируют для отделения геля, который лучше применять в свежеприготовленном виде.

(объемы элюционных растворов относятся к объему раствора фермента до добавления геля). Элюаты соединяют и применяют в качестве препарата фермента.

Определение инозина [19]

Описанный здесь метод применялся только для анализа чистых водных растворов инозина.

Принцип. Нуклеозидфосфорилаза катализирует реакцию:

$$\text{Инозин} + \text{фосфат} \rightleftarrows \text{гипоксантин} + \text{рибозо-1-фосфат}. \qquad (1)$$

При pH 7,4 и в присутствии избыточного фосфата реакция протекает полностью слева направо. Гипоксантин окисляется затем ксантиноксидазой [1] в мочевую кислоту:

$$\text{гипоксантин} + 2H_2O + 2O_2 \rightarrow \text{мочевая кислота} + 2H_2O_2. \qquad (2)$$

Для этого достаточно кислорода, растворенного в опытной смеси. Измеряют увеличение экстинкции мочевой кислоты при 293 *ммк*.

Реактивы: 1) фосфатный буферный раствор (0,05 *М*, pH 7,4): а) 27,2 *г* KH_2PO_4 растворяют в бидистиллированной воде до 1000 *мл*; б) 53,6 *г* $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ растворяют в бидистиллированной воде до 1000 *мл*; 19,0 *мл* раствора *а* смешивают с 81,0 *мл* раствора *б* и доливают бидистиллированной водой до 400 *мл*; 2) этилендиаминтетраацетат (0,01 *М*): 0,372 *г* ЭДТА-$Na_2H_2 \cdot 2H_2O$ растворяют в 100 *мл* бидистиллированной воды; 3) стандартный раствор инозина ($5 \cdot 10^{-3}$ *М*): 26,8 *мг* инозина растворяют в бидистиллированной воде до 20 *мл*; 4) нуклеозидфосфорилаза (129 000 *ед/мл*) [2]: препарат (см. стр. 367) соответственно разводят дистиллированной водой; 5) ксантиноксидаза (14 000 *ед/мл*) [3]: продажный препарат разводят соответственно дистиллированной водой.

Растворы фермента, замороженные при — 17°, сохраняются по меньшей мере 1 год. При повторном замораживании и оттаивании отмечены потери активности. Все остальные реактивы сохраняют при 0° и изготовляют заново через каждые 3 месяца.

Техника. *Исследуемый материал.* Описанным здесь методом анализировали только чистые водные растворы инозина.

Постановка опыта. Реактивы перед употреблением приводят к комнатной температуре. Растворам ферментов дают оттаять и оставляют стоять в ледяной бане.

---

[1] КФ 1.2.3.2.

[2] Единицей является количество фермента, которое в 3 *мл* смеси опыта (0,05 *М* буферного раствора фосфата, pH 7,4; толщина слоя 1 *см*) с 1,5 *мк* моля инозина и избытком ксантиноксидазы при 20° при длине волны 293 *ммк* повышает экстинкцию за 1 мин. на 0,001 (спектрофотометр Бекмана).

[3] Сюда относится все то же самое, что описано для нуклеозидфосфорилазы (см. стр. 367) только с гипоксантином в качестве субстрата.

Метод определения: измерение ведут при 293 *ммк*; толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 3,0 *мл*. Измерение ведут против сравнительной кюветы.

Отмеривают пипеткой в:

кювету с опытной смесью	сравнительную кювету
2,700 *мл* буферного раствора (1)	2,700 *мл* буферного раствора (1)
0,030 *мл* раствора ЭДТА (2)	0,030 *мл* раствора ЭДТА (2)
0,020 *мл* пробы, содержащей 0,1 *мкмоля* инозина или стандартного раствора (3)	0,270 *мл* бидистиллированной воды
0,210 *мл* бидистиллированной воды	
0,035 *мл* (около 500 единиц) раствора ксантиноксидазы (5)	

смешивают, продувают воздух через раствор. Экстинкцию измеряют 5 раз с промежутком в одну минуту; константное начальное значение — E_1. Затем отмеряют пипеткой в кювету с опытной смесью 0,005 *мл* раствора фосфорилазы [1] (4), перемешивают током воздуха, измеряют экстинкцию каждые 5 мин., константное конечное значение — E_2. Экстинкцию раствора фосфорилазы (4) при 293 *ммк* следует измерять отдельно: наполняют две кюветы содержимым сравнительной кюветы, после этого в одну вносят 0,005 *мл* раствора фосфорилазы (4), перемешивают и измеряют повышение экстинкции $E_ф$ против кюветы, свободной от фермента; $E_ф$ незначительна и ее можно измерять только один раз для каждого нового препарата фосфорилазы.

Вычисление.

$$\frac{(E_2 - E_1 - E_ф)\cdot 3}{12} = \text{мкмолей инозина (опытная смесь)},$$

где E_2 — экстинкция после добавления раствора фосфорилазы, E_1 — экстинкция перед добавлением раствора фосфорилазы, $E_ф$ — экстинкция раствора фосфорилазы, 3 — объем опытной смеси, *мл*, 12 — коэффициент экстинкции при 293 *ммк* для превращения гипоксантина в мочевую кислоту (*см²/мкмоль*).

Приложение. *Выделение нуклеозидфосфорилазы* [2]. Метод включает следующие операции: экстракция телячьей селезенки водой, осаждение неактивных белков при pH 5,2 (ацетатный буферный раствор), осаждение активного белка этанолом (20%) при — 5°, фракционирование посредством повторного гомогенизирования осадка этанол/ацетатным буфером и глицин/ацетатным буфером.

---

[1] КФ 2.4.1.1 2.4.4.10.
[2] Детали см. V. Price et al. в кн. Colowick S. a. Kaplan N. (см. сноску 2 на стр.361).

Определение нуклеотидов, нуклеозидов, пуриновых и пиримидиновых оснований [20]

Принцип. Хроматографическое разделение нуклеотидов, нуклеозидов, пуриновых и пиримидиновых оснований проводится на одной колонке Дауэкс-1-Х8 при постоянном pH ацетатного буферного раствора. Регистрация изменения оптической плотности элюата происходит непрерывно на двухлучевом спектрофотометре [1].

Реактивы: 1) буферный раствор; ацетатный буфер pH 4,4, 0,15 *М* и 3,0 *М*; 2) ионообменник: следует применять ионообменную смолу с наименьшим содержанием поперечных связей, этим требованиям удовлетворяет Дауэкс-1-Х8 и Дауэкс-30-Х2, не содержащие дивинилбензол в большом количестве. Дауэкс-1-Х8, при содержании в нем поперечных связей от 2 до 8%, достаточно стоек при 40°, не набухает и не сморщивается; 3) стандартные растворы; готовят исходные 0,01 *М* стандартные растворы в дистиллированной воде всех рибозидов, рибонуклеотидмоно-, ди- и трифосфатов, дезоксирибозидов и дезоксирибонуклеотидмоно-, ди- и трифосфатов, а также соответствующих оснований, за исключением гуанина, концентрация которого должна соответствовать 0,001 *М*. Из этих исходных растворов путем разведения готовят рабочие стандартные растворы с концентрацией 0,002 *М*; исходный стандартный раствор гуанина разбавляют до концентрации 0,002 *М*, а раствор 5-метил-цитозинмонофосфата до концентрации 0,005 *м*.

Техника. *Подготовка хроматографической колонки*. Дауэкс-1-Х8, 200—400 меш, фракционируют в водопроводной воде. Для приготовления длинной колонки (0,9×160 *см*) используют фракцию смолы с диаметром частиц 60 *мк*. Измерение диаметра частиц производят или прямым способом, в микроскопе, снабженном окулярмикрометром, или посредством фотографического увеличения. Большое количество мелких частиц нежелательно, так как чрезмерно мелкие частицы слипаются с крупными и затрудняют фракционирование, в подобных случаях рекомендуется гидравлическое фракционирование производить разведеной соляной кислотой.

Перед употреблением ионообменник обрабатывают едким натром, соляной кислотой и уксусной кислотой. Затем суспензию растирают с 3 *М* уксусной кислотой для удаления пузырьков углекислого газа. Осевшую смолу суспендируют в 0,15 *М* растворе натрийацетатного буфера pH 4,4. Обработанную таким способом ионообменную смолу наслаивают в трубку подходящего диаметра под небольшим давлением, жидкость над осевшей смолой отсасывают водоструйным насосом, опустив в слой жидкости полиэтиленовую трубку. Всю операцию производят постепенно, внося смолу порциями, пока высота колонки слоя осевшей смолы не достигнет 150—160 *см*, после чего колонку промывают 0,15 *М* раствором ацетатного буфера в течение нескольких часов.

---

[1] Детали см. N. G. Anderson et al. Analyt. Biochem., 1963, 6, 153—169.

Если не произошло деформации частиц ионообменной смолы, скорость вытекания жидкости из колонки будет прямо пропорциональна давлению и обратно пропорциональна температуре. Колонку после употребления можно регенерировать, обрабатывая находящуюся в ней смолу 1н. соляной кислотой, 1н. раствором едкого натра и 3 *М* раствором уксуснокислого натра с pH 4,4 и наконец 0,15 *М* ацетатным буфером pH 4,4, однако эта процедура вызывает сморщивание частиц ионообменника и в большинстве случаев удобнее воспользоваться новой порцией ионообменной смолы.

Постановка опыта. Градиент концентрации элюента создается следующим способом: собирают систему из двух- или трехмерных цилиндров объемом 2000 *мл*, к первому цилиндру подсоединяют насос и в него помещают магнит от магнитной мешалки. При работе с длинной колонкой в первый цилиндр заливают 600 *мл* 0,15 *М* раствора уксуснокислого натра, во второй (и в третий, если его применение необходимо) 3,0 *М* раствор уксуснокислого натра, оба раствора должны иметь pH 4,4. Над первым цилиндром укрепляется 150-ваттная лампа, тепло от которой достаточно для предотвращения появления пузырьков газа.

Исследуемый материал, например 0,5 *мг* щелочного гидролизата препарата РНК или 1,4 *мл* смеси стандартов, состоящей из 0,2 *мл* каждого рабочего стандартного раствора рибозидов и рибозомонофосфатов и 1 *мл* каждого стандартного раствора рибозодифосфатов, наносится на колонку.

Разделение ведут при температуре колонки 40° в течение 28 час., скорость истечения устанавливают в пределах от 0,715 до 1,10 *мл/мин*.

Оптическую плотность регистрируют при 260 и 280 *ммк*, применяя проточную кварцевую кювету емкостью 1 *см*.

Для того чтобы ускорить процедуру разделения последних порций, применяют более короткую колонку размером 50 × 0,9 *см*. Элюирующий раствор в этом случае должен иметь более высокую концентрацию с содержанием ацетат-иона 1 *М*, хлор-иона— 0,5 *М*. pH 3,6. Градиент элюента создается разбавлением исходного раствора вдвое и постепенным линейным перемешиванием разбавленного и исходного буферных растворов. Элюцию проводят при комнатной температуре; на полное разделение УТФ, АТФ и ГТФ затрачивается 6 час.

Пирсон и Тубе предложили [21] чуствительный, ферментативный метод определения карнитина в тканевых экстрактах, основанный на реакции: ацетил - КоА + карнитин → ацетил-карнитин + + КоА; КоА + сорбит + АТФ → сорбоил-КоА + АМФ + пирофосфат.

Ацетоновый порошок печени крыс экстрагируют хлорной кислотой. Экстракт инкубируют 15 мин. в щелочной среде с восстановленным глютатионом, затем еще 15 мин. при pH 6,5 с N-этилмалеимидом, после чего доводят до pH 7,4 и инкубируют с ацетил-КоА, АТФ и

сорбитом в присутствии карнитин-ацетилтрансферазы [1] из сердца свиньи и ацил-КоА-синтетазы [2] из печени быка. Образование сорбо-ил-КоА оценивают по увеличению экстинкции при 360 *ммк*. Холин, *D*-глюкозамин, глицин не мешают определению карнитина. Содержание карнитина в печени крыс составляет 365 *мкмолей* на 1 *г* свежего веса.

Маркис разработал [22] другой ферментативный метод определения свободного карнитина в тканях крысы. Метод основан на том, что карнитинацетилтрансфераза из сердца свиньи катализирует реакцию ацетилирования карнитина (бутират β-окси-γ-триметил-аммония):

$$\text{карнитин} + \text{ацетил-КоА} \rightleftarrows \text{ацетил-карнитин} + \text{КоА}.$$

Количество КоА, эквивалентное карнитину, определяют спектрофотометрически по реакции с 5,5-дитио-бис-2-нитробензойной кислотой (образующийся тиофенолятион имеет максимум поглощения при 412 *ммк*).

Ткани крысы содержат только (—)-изомер карнитина. Содержание карнитина в различных органах и тканях крысы следующее (в *мг* карнитина на 1 *г* сухого веса ткани): сердце — 4,87; скелетная мышца — 2,68; межлопаточная жировая ткань — 3,14; семенники — 1,74; почка — 1,26; мозг — 0,55 и сыворотка крови — 0,051. Этим методом можно определить 0,005 *мкмолей* карнитина, причем присутствие в экстрактах дезоксикарнитина, холина, ацетилхолина, гамма-аминомасляной кислоты, глицина, бетаина, серина, гистамина, *D*-глюкозамина и *п*-аминобензойной кислоты не мешает определению [21]. Относительно деталей анализа см. также [22].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Fasold H.* u. *Gundkach G.* В кн. Bergmeyer H. Methoden der enzymatischen Analyse. Weinheim, 1962, стр. 350.
2. *Асатиани В. С.* Новые методы биохимической фотометрии. М., изд-во «Наука», 1965, стр. 164.
3. *Wieland.* Th. et al., Bioch. Z., 1955, **326**, 442.
3a. *Cale E.* В кн. Glick D. Methods of Biochemical Analysis. N. Y., v. IV, p. 285, 1957; Crawford L. Bioch. J., 1958, **68**, 221.
4. *Malmstadt H.* a. *Hadjionnou T.* Anal. Chem., 1963, **35**, 4.
5. *Boulanger P.* и. *Osteux R.* В кн. Bergmeyer [1], стр. 367.
6. *Pfleiderer G.* et al. Ann. Acad. Sci. fennicae, A. II, 1955, Ser. 60, 381.
7. *Flavin M.* a. *Slaugter C.* Anal. Chem., 1959, **31**, 1983.
8. *Dickerman H.* a. *Carter M.* Anal. Bioch., 1962, **3**, 195.
9. *Ramadan M.* a. *Greenberg D.* Anal. Bioch., 1963, **6**, 144.
10. *Pfleiderer G.* et al. Bioch. Z., 1955, **326**, 446; 1959, **331**, 245.
11. *Bernt E.* u. *Bergmeyer H.* В кн. Bergmeyer [1], стр. 384.
12. *Meiss M.* et al. J. Lab. Clin. Med., 1964, **64**, 512.
13. *Bernt E.* u. *Bergmeyer H.* В кн. [10], стр. 401.
14. *Tanzer M.* a. *Gilvarg C.* J. Biol. Chem., 1959, **234**, 3201.
15. *Praetorius E.* В кн. Bergmeyer H., см. [10], стр. 500.
16. *Möllering H.* u *Bergmeyer H.*, см. [10], стр. 491.
17. *Coddington A.*, см. [10] стр. 505.

[1] КФ 2.3.1.7.
[2] КФ 6.2.1.2 6.2.1.3.

18. *Jorgensen S.* u. *Poulsen H.* Acta pharmacol. toxicol. København, 1955, **11**, 223.
19. *Coddington A.*, см. [10], стр. 502.
20. *Anderson N.* et al. Anal. Bioch., 1963, **6**, 153.
21. *Pearson D.* a. *Tubbs P.* Bioch. J., 1964, **91**, 2.
22. *Marquis N.* J. Lipid. Res., 1964, **5**, 184.
23. *Crawford* L. Bioch. J., 1958, **68**, 221.
24. *Grein L.* u. *Pfleiderer G.* Bioch. Z., 1958, **330**, 433.
25. *Stern J.* et al. J. Biol. Chem., 195, **198**, 313.
26. *Hohorst H.* Bioch. Z., 1956, **328**, 509.
27. *Siegel J.* et al. Arch. Bioch. Bioph., 1959, **82**, 288.
28. *Thorn W.* et al. J. Neurochem., 1958, **2**, 150.
29. *Flavin M.* a. *Slaughter C.* J. Biol. Chem., 1960, **235**, 1103.
30. *Huggins C.* a. *Miller O.* J. Biol. Chem., 1956, **221**, 377.
31. *Schormüller J.* u. *Tänzler H.* Z Lebensmittel-Unters. u. Forsch., 1959, **109**, 234.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПИРТОВ, АЛЬДЕГИДОВ, КЕТОНОВ

Определение уксусного альдегида [1]

Принцип. Альдегиддегидрогеназа [1] из дрожжей катализирует реакцию:

ацетальдегид + НАД$^+$ ⇄ ацетат + НАД-Н + Н$^+$.

Фермент требует наличия ионов калия в относительно высокой концентрации. Его кинетические свойства очень отличаются от свойств альдегиддегидрогеназы из печени. Сродство между дрожжевым ферментом и ацетальдегидом, в противоположность ферменту печени, очень незначительное. Хотя равновесие реакции направлено в сторону образования ацетата и НАД-H_2, количественное окисление ацетальдегида ферментом дрожжей не осуществляется полностью. Величиной измерения служит не количество образующегося ацетальдегида, а скорость реакции, которая пропорциональна в пределах известных границ концентрации.

Реактивы (все реактивы готовят на воде свежедистиллированной в стекле или освобожденной от ионов): 1) метафосфорная кислота (0,74 *М* раствор): 12 *г* метафосфорной кислоты превращают в порошок и растворяют в 100 *мл* дистиллированной воды. Препарат содержит много пирофосфата натрия, что, однако, не нарушает хода анализа. Раствор сохраняют хорошо закупоренным при 4°. Ввиду быстрого гидролиза его следует возобновлять через несколько дней. Непосредственно перед употреблением раствор титруют стандартной щелочью (см. [1]); 2) едкий калий (1,25 *М* раствор): 70 *г* КОН растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*; 0,5 *мл* этого раствора употребляют для нейтрализации 2 *мл* плазмы крови, очищенной от белков. Если метафосфорная кислота частично гидролизована, можно развести основной раствор 1,5 *М* раствором КОН таким образом, чтобы 0,5 *мл* его соответствовали 2 *мл* фильтрата плазмы; 3) хлорид калия (1,0 *М* раствор): 74,5 *г* KCl растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 1000 *мл*; 4) буферный раствор: 30 *г* трис-(гидроксиметиламинометана) растворяют приблизительно в 150 *мл* дистиллированной воды и

[1] КФ 1.2.1.3 1.2.1.4 1.2.1.5 1.2.1.10.

устанавливают pH равным 0,8 (на стеклянном электроде) посредством 4н. HCl, затем доливают дистиллированной водой до 250 *мл*; 5) ЭДТА (0,1 *М* раствор): 3,7 *г* ЭДТА-$Na_2H_2 \cdot 2H_2O$ растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*; 6) меркаптоэтанол (0,1 *М* раствор): 0,78 *г* меркаптоэтанола растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*; 7) никотинамидадениндинуклеотид (0,015 *М* раствор НАД-H_2): 100 *мг* НАД растворяют в дистиллированной воде и объем доводят до 10 *мл*; раствор возобновляют каждые 2 недели (хранение при 4°); 8) смесь буферного раствора НАД: непосредственно перед употреблением смешивают 3 объема раствора (3)+6 объемов раствора (4)+0,5 объема раствора (5)+0,5 объема раствора (6)+0,5 объема раствора (7); 9) основной раствор ацетальдегида (2 *М*): приблизительно 10%-ный раствор свежеперегнанного ацетальдегида приготовляют в дистиллированной воде; точную концентрацию определяют титрованием (реакция с бисульфитом натрия и титрование избытка последнего раствором йода; раствор сохраняется долгое время при 4°; его титруют каждые два месяца, через полгода возобновляют; 10) альдегиддегидрогеназа (10 000 *ед/мл*): замороженный раствор фермента оттаивают и соответственно разводят в дистиллированной воде (детали получения см. [1]).

Все реактивы сохраняют в холодильнике (4°), хорошо закупоривают, чтобы избежать загрязнений альдегидами.

Техника. *Подготовка исследуемого материала.* Метод может быть применен для анализов плазмы крови, сыворотки и органов. Кровь собирают в полиэтиленовые пробирки центрифуги, которые немедленно ставят на лед и закрывают пластмассовыми пробками. Кровь центрифугируют при 0° (2000 *g*). При этих условиях она не свертывается.

В стеклянные центрифужные пробирки, емкостью около 8 *мл*, со стеклянными пробками отмеривают 2 *мл* холодного раствора метафосфорной кислоты (1) и добавляют 2 *мл* свежеполученной плазмы. После сильного встряхивания и центрифугирования (10 мин. при 2000 *g*) осторожно отмеривают пипеткой 2 *мл* прозрачной надосадочной жидкости в холодные пробирки, снабженные стеклянными пробками. Нейтрализуют 0,5 *мл* раствора KOH (2). На этой ступени пробы могут сохраняться, если нужно, в холодильнике в течение ночи без значительных потерь ацетальдегида.

Постановка опыта. Измерение ведут при 340 *ммк* в кварцевых кюветах; толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 3,025 *мл*; измерения ведут против контрольной кюветы с водой.

Измерения в серии опытов должны проводиться при постоянной температуре (ниже 15°) и с одинаковым количеством фермента. До измерения все реактивы держат в ледяной бане. Кюветы накрывают полиэтиленовой пленкой для защиты от испарения ацетальдегида. Для каждой серии устанавливают «слепое» значение реактивов. Для этого разводят раствор метафосфорной кислоты (1) дистиллированной водой 1 : 1 и нейтрализуют раствором KOH (2). Из это-

го раствора берут для опыта 2 *мл* вместо безбелковой пробы. Если реактивы не содержат ацетальдегида, то экстинкция за 10 мин. увеличивается меньше чем на 0,010.

Содержание ацетальдегида в стандартных растворах, содержащих возрастающие количества ацетальдегида (1—10 *мкг*), определяют следующим образом: основной раствор ацетальдегида (9) разводят дистиллированной водой от 1 : 4000 до 1 : 400, отсюда прибавляют к пробам по 0,025 *мл* (соответствующих 1—10 *мкг* ацетальдегида).

Отмеривают пипеткой в кюветы 2 *мл* безбелковой пробы. В слепой опыт вместо этого берут нейтрализованную, разведенную метафосфорную кислоту (и дополнительно 0,025 *мл* раствора ацетальдегида — в стандартные растворы). Смешивают с 1 *мл* смеси буферного раствора НАД (8), размешивают и отсчитывают экстинкцию E_1; быстро добавляют сюда же 0,025 *мл* раствора альдегиддегидрогеназы (10), по меньшей мере 250 ед., нажимают секундомер и точно через 10 мин. снова отсчитывают экстинкцию E_2. $E_2 - E_1 = \Delta E$ (входит в вычисление).

Вычисление. Из значения ΔE проб стандартных растворов следует вычесть результат слепого опыта. Поправленные таким образом величины пропорциональны концентрации ацетальдегида, если они меньше 0,25 при продолжительности измерения в 10 мин. Если ΔE_A соответствует в главном опыте концентрации альдегида A, а ΔE_A — концентрации альдегида C в стандартном опыте, то

$$\frac{\Delta E_A}{\Delta E_C} \cdot C = A \text{ (мкг ацетальдегида в кювете).}$$

Концентрация ацетальдегида в исследуемой плазме составляет:

$$\frac{E_A}{E_C} \cdot C \cdot 3{,}75 = \text{(мкг ацетальдегида в 1 мл плазмы)},$$

где $3{,}75 = 2{,}5 \cdot 1{,}75$ (разведение при осаждении белка) $\times$ (разведение в главном опыте).

При постоянной концентрации субстрата скорость реакции не является линейно-пропорциональной концентрации фермента. При высокой концентрации фермента обе величины, даже в широких пределах, независимы друг от друга. Лучше всего применять лежащие в этой области концентрации фермента, потому что здесь исключается влияние даже небольших количеств тормозящих веществ. 0,1—0,2 *мкг* ацетальдегида в 1 *мл* плазмы могут быть качественно обнаруживаемыми, а около 1 *мкг* ацетальдегида в 1 *мл* плазмы уже можно точно определить количественно. Измеряемая разница экстинкции соответствует приблизительно окислению 50%-ного ацетальдегида в ацетат.

Источники ошибок. Другие альдегиды, например пропионовый, масляный и бензойный, реагируют также с альдегиддегидрогеназой дрожжей; формальдегид, глицериновый, салицило-

вый альдегиды и кетоны не реагируют. Так как препарат фермента очищен лишь относительно, он может содержать другие дегидрогеназы, зависимые от НАД, и действовать еще и на другие составные части плазмы. Препарат фермента, приготовленный по Лундквисту [1], практически таких примесей не содержит. Точность метода 1,5%. Метод дает более стабильные результаты, чем другие ферментные методы определения уксусного альдегида [2, 3].

Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

Определение гликолевого альдегида [4]

П р и н ц и п. Кристаллическая алкогольдегидрогеназа [1] (АДГ) из пекарских дрожжей катализирует реакцию:

$$\text{гликолевый альдегид (ГА)} + \text{НАД-Н} + H^+ \rightleftarrows \text{этиленгликоль} + \text{НАД}^+.$$

Равновесие реакции лежит далеко на правой стороне. Так как сродство гликолевого альдегида к АДГ невелико, то необходимо работать с высокой концентрацией АДГ.

Р е а к т и в ы: 1) цитратный буферный раствор (0,33 *М*, pH 6,0): 17,5 *г* лимонной кислоты растворяют приблизительно в 100 *мл* бидистиллированной воды, добавляя около 45 *мл* 20%-ного едкого натра, pH устанавливают равным 6,0 и доливают бидистиллированной водой до 250 *мл*; 2) восстановленный никотинамидадениндинуклеотид: 10 *мг* НАД-Н-Na_2 растворяют в 1,0 *мл* бидистиллированной воды; 3) дрожжевая алкогольдегидрогеназа, АДГ (30 *мг* белка на 1 *мл*); взвесь более высокой концентрации разбавляют раствором 2,4 *М* сульфата аммония.

Т е х н и к а. *Подготовка исследуемого материала.* Обработка пробы ведется, как указано при описании определения пировиноградной кислоты (см. стр. 197).

Постановка опыта. Измерение ведут при 366 (стеклянные кюветы) или 340 *ммк* (кварцевые кюветы); толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 3,0 *мл*. Буферный раствор и раствор исследуемой пробы доводят до комнатной температуры.

В указанной ниже последовательности отмеривают пипеткой: в кювету с опытом — 1,00 *мл* буферного раствора (1), 0,03 *мл* раствора НАД-H_2 (2), пробу (1,00 *мл*) + H_2O до 2,94 *мл*; в контрольные кюветы — 1,00 *мл* буферного раствора (1), 0,03 *мл* раствора НАД-H_2 (2), H_2O до 2,94 *мл*.

Отмечают экстинкции в обеих кюветах (спектрофотометр Бекмана). Если сдвиг экстинкций не превышает 0,001—0,002 за 30 сек., в обе кюветы добавляют по 0,6 *мл* взвеси АДГ (3) (около 2 *мг* белка). Реакция протекает за 15—25 мин. В опытной кювете получают тогда такое же (очень небольшое) уменьшение экстинкции, как и в контрольной. Кювета, в которой содержатся все компоненты опыта

---

[1] КФ 1.1.1.1 1.1.1.2.

без фермента, не показывает в общем сколько-нибудь значительного изменения экстинкции во времени. Разница экстинкции между пробой и контролем после начала реакции минус разница экстинкций между пробой и контролем до начала реакции с АДГ дает ΔE, которую включают в вычисление. Изменение экстинкции, вызванное абсорбцией света самим препартом фермента и разведением пробы при добавлении фермента, устанавливают, добавляя фермент в контрольную кювету или повторно добавляя фермент в кювету опыта после осуществления реакции. Это изменение экстинкции может быть положительным или отрицательным в зависимости от величины начальной экстинкции, обусловленной пробой и НАД-H_2, а также от абсорбции света раствором фермента; практически его можно не учитывать.

Вычисление. Для вычисления пользуются формулой

$$\frac{\Delta E \cdot V}{\varepsilon \cdot d} = \textit{мкмолям} \text{ гликолевого альдегида в содержимом кюветы,}$$

где ΔE представляет величину убыли экстинкции (исправленную соответственно приведенным выше данным), наступающей после добавления АДГ. Коэффициент экстинкции ε для НАД-H_2 составляет при 366 *ммк* —3,3, при 340 *ммк* — 6,2 и при 344 *ммк* — 5,9 *см*^{2}/*мкмоль*; d — толщина слоя кюветы в *см*, V — общий объем исследуемой жидкости в кювете, *мл*.

Если опыт проводят не при pH 6,0, а при pH 7,4, то в той же кювете, в которой был определен гликолевый альдегид с АДГ, можно определять пировиноградную и оксипировиноградную кислоты также при помощи кристаллической лактатдегидрогеназы [1], а L- эритрулозу — при помощи полиолдегидрогеназы [5].

Источники ошибок. Необходимо учитывать, что при высоких концентрациях АДГ, требуемых для описанного здесь анализа, кроме ацетальдегида и гликолевого альдегида, НАД-H_2 восстанавливает одновременно следующие альдегиды: формальдегид, пропионовый, масляный, валериановый и глицериновый. Точность метода около 2%.

Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

Определение этилового спирта [6]

Принцип. Открытие и выделение в кристаллической форме ферментов, катализирующих дегидрирование первичных алкоголей с образованием альдегидов — алкогольдегидрогеназы (АДГ) дрожжей и печени млекопитающих, создало возможность определения этилового спирта при помощи оптического теста Варбурга. В реакции участвует НАД в качестве кофермента.

[1] КФ 1.1.1.27 1.1.2.3.

Реакция, катализируемая АДГ, выражается следующим уравнением:

этиловый спирт + НАД$^+$ $\rightleftarrows$ ацетальдегид + НАД-Н + Н$^+$.

При высоких pH (при связывании образующегося альдегида семикарбазидом) равновесие реакции можно настолько сдвинуть вправо, что реакция будет протекать почти с полным разложением спирта. Восстановленная форма НАД-H_2 определяется спектрофотометрически благодаря наличию максимума поглощения при 340 *ммк*. В зависимости от диапазона концентрации этилового алкоголя, присутствующего в исследуемом материале, разработаны три различные модификации, отличающиеся по техническим приемам. Во всех случаях сохраняется строгая пропорциональность между концентрацией искомого вещества и оптической плотностью, корректируемой контрольным определением.

Реактивы: 1) буферный раствор: 10 *г* пирофосфата натрия, 2,5 *г* солянокислого семикарбазида, 0,5 *г* глицина и 10 *мл* 2н. раствора едкого натра растворяют в воде до конечного объема 300 *мл*; pH доводят до 8,6—8,7 добавлением 2н. раствора NaOH; 2) буферный раствор: 15 *г* глицина, 0,3 *г* этилендиаминтетраацетата (трилон Б), 2,5 *г* солянокислого семикарбазида и 25 *мл* 2н. раствора едкого натра растворяют в воде до конечного объема 200 *мл*; pH смеси доводят до 8,8—8,9; 3) хлорная кислота, 3,4%-ный раствор: 29 *мл* 70%-ной хлорной кислоты разводят бидистиллированной водой до 1000 *мл*; 4) хлорная кислота, 5,1%-ный раствор; 5) раствор НАД: 100 *мг* чистого НАД растворяют в 10 *мл* воды; раствор сохраняют при 0°, он пригоден в течение 2 недель; 6) суспензия кристаллической дрожжевой АДГ; кристаллы суспендируют в растворе сернокислого аммония 0,6 *М* насыщения; концентрация кристаллов в подобной взвеси равна 30 *мг/мл*. Кристаллический препарат АДГ готовится из сухих дрожжей методом Рекера [7]; суспензия устойчива в течение нескольких месяцев при хранении при 0°; активность можно определять по Рекеру, однако обычно в этом нет необходимости; препарат пригоден, если при проведении реакции со стандартным раствором максимальное поглощение света достигается примерно через 30 мин.

Весьма важно, чтобы все применяемые реактивы не содержали следов спирта. Обычно следы алкоголя содержат продажный препарат семикарбазида (спирт применяется для его перекристаллизации). Очистку можно произвести путем растворения 100 *г* препарата в 300 *мл* воды при 60° и отгонки половинного количества воды под уменьшенным давлением в колбе Клайзена. Кристаллы, выпадающие при охлаждении, не содержат алкоголя.

Техника. *Модификация 1; определение 0,2—5 мг/г этилового спирта*. Проба исследуемого материала отбирается путем отвешивания на торзионных весах или отмеривается по объему. Осаждение белка производят добавлением 8—10-кратного количества хлорной кислоты (3,4%-ного раствора) в небольших пробирках.

Для достижения максимальной точности в анализ берут 500 *мг* исследуемого материала. После перемешивания смеси стеклянной палочкой ее фильтруют или центрифугируют. В ряд пробирок (6) наливают по 3 *мл* смеси, состоящей из 30 объемов буферного раствора (1), 10 объемов раствора НАД и 1 объема суспензии АДГ (готовится перед употреблением). Затем в каждую пробирку вносят по 50 *мкл* безбелкового фильтрата. Оптическую плотность определяют при 340 *ммк* не ранее 60 и не позднее 90 мин. при комнатной температуре (22—25°). Контрольное определение производят так же, с той разницей, что вместо безбелкового фильтрата добавляют по 50 *мкл* воды.

Стандартное определение проводят в тех же условиях с 50 *мкл* стандартного раствора этилового спирта, содержащего 2 *мг* алкоголя в 1 *мл*.

Вычисление. Если принять, что оптическая плотность пробы равна a, стандарта — s, контроля — b, а количество исследуемого материала, взятого в анализ, — w (в *мг*), объем хлорной кислоты (в *мл*) — v и содержание алкоголя в стандарте — d (в *мг*), то концентрация (C) этилового алкоголя в 1 *г* исследуемого материала будет выражаться:

$$C = [(a - b)\ (v + wk)\ d]/[(s - b)\ 50\ w].$$

Фактор k зависит от содержания воды в исследуемом материале (в *г/г*). Для цельной крови $k = 0{,}8$, для сыворотки $k = 0{,}9$. При анализе мочи осаждение белка не требуется. Проба соответственно разведенной мочи добавляется прямо к забуференному раствору фермента.

Модификация 2; *определение 0,02—0,2 мг/мл этилового спирта.* Исследуемый материал освобождают от белка добавлением 1 объема 5,1%-ного раствора хлорной кислоты. Прозрачный фильтрат нейтрализуют 4н. раствором едкого натрия (50 *мкл* на 1 *мл* фильтрата). В ряд пробирок (6) наливают по 3 *мл* смеси буферного раствора 1 с раствором НАД и суспензией АДГ (см. выше). Добавляют также по 100 *мкл* нейтрализованного безбелкового фильтрата и через 60 мин. определяют оптическую плотность при 340 *ммк*. Контрольное определение и определение стандарта проводят соответственно со 100 *мкл* воды и 100 *мкл* свежеразбавленного стандартного раствора.

Вычисление. Пользуясь теми же обозначениями, концентрацию этилового алкоголя в последующем материале (в *мг/мл*) можно вычислить по формуле:

$$C = [(a - b)\ (1 + k)\ d \cdot 1{,}05]/[(s - b) \cdot 100].$$

Модификация 3; *определение этилового спирта в количествах, меньших 0,02 мг/мл.* Осаждение белка, фильтрование или центрифугирование и нейтрализацию проводят так же, как и в модификации *2*. Готовят смесь буферного раствора (2) (20 частей с раствором НАД — 1 часть) и разливают по пробиркам порциями 2 *мл*. В каждую пробирку добавляют по 1 *мл* нейтрализованного фильтрата и определяют оптическую плотность при 340 *ммк*.

Контрольное определение проводят с 1 *мл* нейтрализованной хлорной кислоты, разведенной в отношении 1 : 1. Стандартное определение проводят с 1 *мл* нейтрализованной хлорной кислоты, разведенной в отношении 1 : 1 и содержащей 10 *мкл* алкоголя после разведения; затем во все пробирки добавляют по 10 *мкл* суспензии фермента и через 1 час определяют прирост оптической плотности. Эта процедура необходима, так как фильтрат обладает значительным поглощением при 340 *ммк*. Оптическая плотность в случае анализа крови или сыворотки равна около 0,03 (спектрофотометр Бекмана). Концентрацию этилового алкоголя (в *мг* на 1 *мл* исследуемого материала) вычисляют по формуле:

$$C = [(a - b)(1 + k)\,d \cdot 1{,}05]/[(s - b) \cdot 100],$$

где a, b и s обозначают повышение оптической плотности после ферментативной реакции. При контрольном определении и определении оптической плотности стандарта пользуются водой вместо нейтрализованной хлорной кислоты, поскольку установлено, что влияние последней на фермент незначительно.

Источники ошибок. Для получения хороших результатов при пользовании ферментативными методами необходимо, чтобы контрольные определения давали бы достаточно низкие значения.

Все применяемые реактивы должны быть высокой чистоты и не содержать следов алкоголя. Свежеприготовленные растворы дают более высокие значения при контрольном определении, поэтому необходимо придерживаться указанных сроков приготовления и хранения растворов. При соблюдении всех указанных условий значения контрольных определений не превышают 0,05—0,06. Источником ошибок могут служить тяжелые металлы в случае их присутствия в реактивах в количествах, достаточных для подавления ферментативной реакции.

Стандартное отклонение при пользовании тремя описанными модификациями метода составляет: модификация *1* : ± 0,0155; модификация *2* : ± 0,00134; модификация *3* : ±0,000138; стандартное отклонение в процентах средних величин соответственно: ± 1,1; ± 1,45; ± 0,7.

Высокая специфичность, присущая ферментативным методам, позволяет определить посредством этого метода с высокой точностью даже крайне малые количества этилового спирта.

Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

Определение глицерина (глицерола) [8]

Принцип. Глицерин превращается в глицерол-1-фосфат в присутствии глицерокиназы [1] (ГК) и аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ). Под воздействием дегидрогеназы глицерофосфата и при

---

[1] КФ 2.7.1.30.

участии никотинамидадениндинуклеотида (НАД) глицерол-1-фосфат окисляется в фосфодиоксиацетон, а НАД переходит в восстановленную форму ($НАД-Н_2$), количество которой соответствует содержанию глицерина в исходной смеси. $НАД-Н_2$ определяется флуорометрически в концентрации, не превышающей 10^{-5} – 10^{-7} *М*.

Реактивы: 1) сернокислый цинк (0,0087 *М* раствор); 2) гидроокись бария (0,083 *М* раствор); 3) АТФ (0,02 *М* раствор), сохраняют в виде небольших отдельных порций в холодильнике; 4) НАД (0,03 *М* раствор), сохраняют в замороженном состоянии; 5) цистеин (0,2 *М* раствор): 35 *мг* солянокислого цистеина растворяют в 1 *мл* 0,4н. раствора едкого натра, готовят перед употреблением; 6) гидразиновый буферный раствор 1 *М*, содержащий 1,5 *М* хлористого магния, рН 9,4, хранят при 3°; 7) глицерокиназа [1] (ГК), 1 *мг/мл*, хранят при 3°; 8) дегидрогеназа глицерофосфата, 10 *мг мл*, хранят при 3°; 9) разбавитель: 0,01н. раствор едкого натра, содержащий двунатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА -2Na) в концентрации 0,001 *М*; 10) глицерин, исходный раствор 0,02 *М*; рабочий стандартный раствор, 0,002 *М* и 0,004 *М*. Исходный раствор хранят в замороженном состоянии, рабочий стандартный раствор—при 3°; 11) реактив на глицерол; непосредственно перед опытом готовят следующую смесь, рассчитанную на 0,1 *мл* исследуемого материала: 0,002 *М* АТФ — 0,1 *мл*, 0,03 *М* НАД – 0,1 *мл*, 0,2 *М* цистеина — 0,1 *мл*, гидразинового буфера — 0,7 *мл*, ГК — 1 *мкг* и ГДГ — 5 *мкг*. На каждую пробу расходуется по 0,1 *мл* этого реактива.

Техника. *Подготовка исследуемого материала*. После обработки поверхности кожи 70%-ным этанолом и обсушивания ватным тампоном досуха производят капиллярную пункцию и, набрав 0,1 *мл* крови, переносят ее в пробирку с 0,5 *мл* 0,0087 *М* раствора сернокислого цинка. Пробы крови помещают в лед, затем в каждую добавляют по 0,5 *мл* 0,083 М раствора едкого барита, оставляют стоять в течение 5 мин. и центрифугируют. Надосадочную жидкость либо непосредственно берут в анализ, либо замораживают. Если по условиям опыта требуется отбирать пробы гепаринизированной крови большего объема, то их ставят на лед до отделения плазмы и затем поступают с пробами плазмы так же, как с пробами крови. Вся процедура должна занять не более 1 часа времени.

Постановка опыта. 0,2 *мл* безбелковой надосадочной жидкости и такие же количества дистиллированной воды и стандартного раствора вносят в пробирки с соответствующими обозначениями и добавляют в каждую по 0,1 *мл* реактива на глицерин. Пробирки закрывают пробками и оставляют на 60 мин. при комнатной температуре. Затем в каждую пробирку добавляется по 2 *мл* разбавителя. Измеряют флуоресценцию разбавленных проб в области 485 *ммк* при длине волны 350 *ммк*.

---

[1] КФ 2.7.1.30.

Следует тщательно подобрать такие пробирки, которые не давали бы флуоресценции с реакционной смесью. Обычная мойка пробирок хромовой смесью и тщательное споласкивание оказывается достаточным, однако, по-видимому, можно пользоваться пробирками, изготовленными из некоторых пластических материалов. Следует также проверить на флуоресценцию и дистиллированную воду.

Вычисление. Из показаний опытной пробы и стандарта вычитают показания слепой пробы. Измерив флуоресценции стандартного раствора при двух разведениях, строят соответственно калибровочную кривую, по которой находят неизвестную концентрацию глицерина в опытной пробе, соответствующую показаниям ее флуоресценции. Калибровочная кривая должна выражать линейную зависимость между этими величинами и проходить через начало координат. Величину, найденную по калибровочной кривой, умножают на разведение исследуемого материала.

Для определения глицерина в 0,025 *мл* исследуемого материала концентрацию НАД снижают до 0,0075 *М*, что обеспечивает достаточно низкие показания слепой пробы и должную скорость ферментативной реакции.

Источники ошибок. Если препарат ГК дает значительную флуоресценцию в контрольной пробе, то его следует очистить посредством диализа против 2,2 *М* раствора сернокислого аммония с pH около 6, предварительно добавив ЭДТА-2Na до концентрации 1 *М* и глицерина до концентрации 0,05 *М*.

Специфичность зависит главным образом от качества применяемого фермента. Неудовлетворительные результаты могут получаться при содержании в исследуемом материале флуоресцирующих примесей.

Метод пока не проверен другими лабораториями.

Сравнительное распространение получил метод Виланда, основанный на фосфорилировании глицерина АТФ и глицерокиназой с образованием глицерол-1-фосфата, который подвергают ферментативному дегидрированию с участием НАД; образующееся при этом количество НАД-H_2 эквивалентно количеству глицерина, что позволяет закончить анализ спектрофотометрическим измерением [1].

Ф. Кроиту [9] рекомендует модификацию ферментативного определения глицерина, основанную на следующих реакциях:

глицерин + АТФ ⇄ (—)-*L*-глицерол-1-фосфат + АДФ; (1)

АДФ + фосфоенолпируват ⇄ АТФ + пируват; (2)

пируват + НАД-Н + H^+ ⇄ лактат + НАД; (3)

глицерин + фосфоенолпируват + НАД-Н + H^+ ⇄ (—)-глицерол-1-фосфат + + лактат + НАД. (4)

Реакции, катализируемые глицерокиназой [2] (1), пируваткина-

[1] Детали анализа см. O. Wieland. Bioch. Z., 1957, **329**, 313.

[2] КФ 2.7.1.30.

зой [1] (2) и лактатдегидрогеназой [2] (3), составляют суммарную реакцию (4), в которой глицерин окисляет эквимолярное количество НАД-H_2, что позволяет закончить анализ спектрофотометрическим измерением изменения экстинкции при 340 *ммк*.

В 1 *мл* объема опытной пробы при толщине слоя 1 *см* можно определить содержание глицерина до концентрации $2 \cdot 10^{-8}$ *молей/мл*.

Состав опытной пробы: 1 *мл* объема опыта содержит (в 10^{-1} *М* триэтаноламин-HCl pH 7,6 буфера: $2 \cdot 10^{-7}$ *моля* НАД-H_2; $5 \cdot 10^{-6}$ *моля* $MgCl_2$; $2 \cdot 10^{-6}$ *моля* АТФ; $1 \cdot 10^{-6}$ *моля* фосфоенолпирувата; 10 *мг* лактатдегидрогеназы (3,6 Е)[3]; 10 *мг* пируваткиназы (0,9 Е); 1 *мг* глицерокиназы (0,08 Е).

Измеряют экстинкцию при 340 *ммк* (толщина слоя 1,0 *см*). Опыт ставят с исключением глицерокиназы.

При анализе гидролизатов употребляемое количество глицерокиназы повышают на 5 или 10 *мг/мл* опытного объема.

Определение глицерина в сыворотке или плазме можно проводить в нейтрализованных хлорнокислых экстрактах или прямо в сыворотке. На 1 *мл* объема опыта берут 0,1—0,5 *мл* сыворотки или плазмы. Определение глицерина проводят как можно скорее после взятия крови.

Детали см. [9]. Метод пока не проверен другими лабораториями.

Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

Определение диоксиацетона [10]

Принцип. Диоксиацетон фосфорилируется глицерокиназой[4] (ГК) с аденозинтрифосфатом (АТФ) в диоксиацетонфосфат:

$$\text{диоксиацетон} + \text{АТФ} \underset{}{\overset{\text{ГК}}{\rightleftarrows}} \text{диоксиацетонфосфат} + \text{АДФ}. \quad (1)$$

В качестве реакции индикатора служит восстановление диоксиацетонфосфата посредством глицерофосфатдегидрогеназы (ГДГ) с редуцированным дифосфопиридиннуклеотидом (НАД-H_2):

$$\text{диоксиацетонфосфат} + \text{НАД-Н} + H^{+} \overset{\text{ГДГ}}{\rightleftarrows} (-)\ \text{глицерин-1-фосфат} + \text{НАД}^{+}.$$

На 1 *моль* диоксиацетона используется 1 *моль* НАД-H_2.

Реактивы: см. определение глицерина; кроме того: 1) триэтаноламиновый буферный раствор (0,05 *М* с $2 \cdot 10^{-3}$ *М* Mg^{2+}, pH 7,15): смесь 0,75 *г* триэтаноламина и 0,2 *мл* 1 *М* раствора $MgCl_2$ растворяют в воде, устанавливают pH 7,15, приливая около 4 *мл*

[1] КФ 2.7.1.40.
[2] КФ 1.1.1.27.
[3] Единица по Рэкеру.
[4] КФ 2.7.1.30.

2н. раствора HCl, доливают дистиллированной водой до 100 *мл*; 5) редуцированный никотинамидадениндинуклеотид (около 0,006 *M* раствор НАД-H_2): 11,2 *мг* НАД-Н-Na растворяют в 2,0 *мл* дистиллированной воды.

Техника. Относительно подготовки исследуемого материала см. стр. 378, определение глицерина.

Постановка опыта. Измерение ведут при 366 *ммк*, толщина слоя 2 *см*, объем анализируемой жидкости 2 *мл*.

В указанной ниже последовательности отмеривают пипеткой в кювету: 1,37 *мл* буферного раствора (1), 0,05 *мл* раствора НАД-H_2 (5), 0,05 *мл* раствора АТФ (4), 0,02 *мл* взвеси ГДГ (6), 0,50 *мл* пробы, очищенной от белка. Дальше работу ведут так же, как и при определении глицерина (см. стр. 379), но после добавления 0,01—0,02 *мл* глицерокиназы (7) наблюдают уменьшение экстинкции.

Вычисление. Так как $\frac{\Delta E \cdot v}{\varepsilon \cdot d}$ = *мкмолям* вещества/опыт, где $v = 2$ *мл*, $\varepsilon_{366} = 3{,}3$ (*см²/мкмоль*), $d = 1$ *см*, то $\frac{\Delta E_{366} \cdot 2}{3{,}3}$ = *мкмолям* диоксиацетона в опыте.

Точность метода 3%.

Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

Определение метилглиоксаля [11]

Принцип. Метилглиоксаль переводят в присутствии глютатиона (GSH) глиоксалазой I [1] (ГЛ-I) количественно в S-лактил-GSH:

$$GSH + CH_3\text{-}CO\text{-}CHO \rightarrow S\text{-лактил-}GSH.$$

Лактил-GSH непосредственно измеряют по экстинкции при 240 *ммк*. В описанных ниже условиях реакция протекает полностью.

Реактивы: 1) фосфатный буферный раствор (0,2 *M*, pH 6,8): а) 1,35 *г* KH_2PO_4 растворяют в бидистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*; б) 1,75 *г* K_2HPO_4 растворяют в бидистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*; 50 *мл* раствора *а* смешивают с 61 *мл* раствора *б* и контролируют значение pH (стеклянный электрод); 2) глютатион (около 0,03 *M* раствор GSH): 10 *мг* глютатиона растворяют в 1 *мл* бидистиллированной воды; 3) глиоксалаза I, ГЛ-1 (1 *мг* белка на 1 *мл*): основную взвесь [2] разводят соответственно 3,4 *M* раствором сульфата аммония.

Все растворы и взвеси хранят закупоренными в холодильнике при 0—4°. Таким образом они сохраняются по меньшей мере несколько недель.

---

[1] Глиоксалаза I—КФ 4.4.1.5.; глиоксалаза II—КФ 3.1.2.6.

[2] Приготовление см. E. Racker. J. Biol. Chem., 1951, **190**, 685.

Техника. *Подготовка исследуемого материала.* До сих пор имеется опыт только с анализом чистых водных растворов. Дистиллят 30%-ного продажного продукта разводят бидистиллированной водой 1 : 50.

Постановка опыта. Измерение ведут при 240 *ммк*; толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 2,99 *мл*, температура комнатная. Измерения ведут против пустого опыта. В кюветы последовательно отмеривают пипеткой: для пустой пробы: 2,90 *мл* фосфатного буферного раствора (1), 0,05 *мл* раствора GSH (2); для анализируемой смеси: 2,90 *мл* фосфатного буферного раствора (1), 0,05 *мл* раствора GSH (2), 0,02 *мл* взвеси ГЛ-I (3).

Хорошо смешивают стеклянной или пластмассовой палочкой, уплощенной книзу, и измеряют экстинкцию E_1.

Затем в обе кюветы вносят, помешивая, 0,02 *мл* пробы; через 8; 10 и 12 мин. измеряют экстинкцию E_2:

$$\Delta E = E_2 - E_1 \text{ (входит в вычисление).}$$

Вычисление. Коэффициент экстинкции S-лактил-GSH равен $E_{240} = 3{,}37$ *см*^{2}/*мкмоль*; таким образом, для содержимого кюветы в 2,99 *мл*:

$$\frac{\Delta E \cdot 2{,}99}{3{,}37} = \text{мкмолям метилглиоксаля в опыте.}$$

Чтобы получить содержание метилглиоксаля в 1 *мл* исследуемого раствора при разведении 1 : 50 и 0,02 *мл* анализируемой пробы, следует умножить 50 на 50 = 2500; таким образом, ΔE 2500 = *мкмолям* метилглиоксаля в 1 *мл*. Точность метода при анализе чистых растворов 1,5%.

Тзао и Шварц [12] предлагают для микроопределения диоксиацетона в биологических жидкостях пользоваться реакцией образования продукта присоединения диоксиацетона к НАД при нагревании в течение 1 часа при 56° безбелкового фильтрата (который получают, осаждая гидратом окиси бария + сернокислый цинк [1]) с НАД при pH 10 (трис-буфер). Спектрофотометрически определяют поглощение при 340 *ммк* и сравнивают с поглощением контрольной пробы. По разности между этими значениями вычисляют изменение концентрации диоксиацетона (уравнение для вычисления см. у авторов). Точность метода — до 2 *мкг* диоксиацетона. Между поглощением и концентрацией диоксиацетона наблюдается линейная зависимость только до 50 *мкг*. Детали см. [12]. Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

---

[1] Смесь равных объемов: 1) 1% раствора $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 2) 0,06н. раствора $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$. К 0,1 *мл* крови прибавляют сначала 1 *мл* раствора (1) и, после размешивания, 1 *мл* раствора (2), затем фильтруют.

Определение миоинозита [13]

Принцип. Инозитдегидрогеназа катализирует реакцию:

$$\text{миоинозит} + \text{НАД}^+ \rightleftarrows \text{сцилломиоинозоза} + \text{НАД-Н} + \text{H}^+.$$

В условиях описанного здесь метода реакция протекает не полностью, но максимальное образование НАД-H_2 пропорционально концентрации инозита. Первым продуктом окисления является, вероятно, сцилломиоинозоза, однако в присутствии мало очищенной инозитдегидрогеназы могут происходить и другие реакции. При определенных условиях сцилломиоинозоза восстанавливается действием НАД-H_2 и инозитдегидрогеназы.

Реактивы: 1) карбонатный буферный раствор (0,5 *M*, pH 2,5): к 0,5 *M* раствору бикарбоната натрия (42 *г* $NaHCO_3$ в 1000 *мл*) добавляют 0,5 *M* раствор карбоната натрия (53 *г* Na_2Co_3 в 1000 *мл*), пока не будет достигнуто значение pH 9,5 (стеклянный электрод); 2) никотинамидадениндинуклеотид (около $2 \cdot 10^{-2}$ *M* раствор НАД): 73,5 *мг* НАД растворяют в 5 *мл* дистиллированной воды; 3) миоинозит ($2 \cdot 10^{-3}$ *M* раствор): 18,0 *мг* миоинозита растворяют в 50 *мл* дистиллированной воды; 4) инозитдегидрогеназа (около 30 *мг* белка на 1 *мл*).

Препарат инозитдегидрогеназы сохраняется при —20° по меньшей мере четыре месяца. Если за это время образуется осадок, то его можно без нарушения ферментативной активности отцентрифугировать и выбросить.

НАД и раствор миоинозита стабильны при —20° в течение многих месяцев. Карбонатный буферный раствор не изменяется при комнатной температуре, если его сохраняют в плотно закупоренной склянке.

Техника. *Подготовка исследуемого материала.* В некоторых случаях сырые экстракты из убитых высокой температурой бактерий ингибируют определение на 10—20%. Таким образом, если в качестве исследуемого материала используют очень сырые экстракты, то рекомендуется удалить основное количество загрязнений барий-цинковым методом. 1 *мл* раствора исследуемого материала, содержащего от 0,01 до 1,0 *мкмоля* инозита, смешивают с 1 *мл* 0,3 н. раствора $Ba(OH)_2$. Нагревают 15 мин. при 100°, добавляют 1 *мл* 5%-ного раствора $ZnSO_4$ и центрифугируют. Надосадочную жидкость смешивают с 2 *мл* водной взвеси, 1 *мл* влажно упакованного амберлита 1RA-400 (форма OH), снова центрифугируют, надосадочную жидкость концентрируют до 1 *мл* в вакууме и применяют аликвоту этой жидкости для анализа на миоинозит.

Содержание миоинозита в исследуемом материале можно установить непосредственно при помощи калибровочной кривой, строящейся заново для каждого ферментного препарата; желательно наряду с анализом исследуемого материала ставить контрольный опыт с кюветами, содержащими 0,02; 0,06 и 0,10 *мкмоля* миоинози-

та (т. е. 0,01; 0,03 и 0,05 *мл* раствора 3). Получают экстинкции около 0,080; 0,240 и 0,400.

Постановка опыта. Измерение проводится при 340 *ммк*; толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 1,0 *мл*. Измерение ведут против сравнительной кюветы с раствором фермента, так как он незначительно абсорбирует при 340 *ммк*. Проба не должна содержать более 0,10 *мкмоля* миоинозита. Калибровочная кривая линейна только на участке, соответствующем содержанию миоинозита не более 10^{-4} *М*.

Растворы отмеривают пипеткой в приведенной ниже последовательности.

Кювета опыта: 0,20 *мл* буферного раствора (1), 0,10 *мл* раствора НАД (2), 0,05 *мл* раствора фермента (4), проба + дистиллированная вода до 1,00 *мл* общего объема.

Сравнительная кювета: 0,20 *мл* буферного раствора (1), 0,10 *мл* раствора НАД (2), 0,05 *мл* раствора фермента (4), 0,65 *мл* дистиллированной воды.

Через 3—4 мин. после начала реакции абсорбция НАД-H_2 достигает наивысшего значения, которое записывают. Понижение экстинкции при продолжительном времени реакции можно, по крайней мере частично, приписать влиянию примеси оксидазы НАД-H_2 в ферментном препарате.

Вычисление. Для экстинкции, полученной при 3—4-минутной реакции, берут по калибровочной кривой соответствующую величину содержания миоинозита в *мкмолях* на 1 *мл* опыта. Для вычисления содержания в пробе эту величину следует разделить на объем пробы. Необходимо учитывать разведение, полученное в результате предварительной обработки. 0,1 *мкмоля* миоинозита весит 18 *мкг*.

Источники ошибок. Монометиловый эфир инозита реагирует как миоинозит. Глюкоза в незначительных концентрациях не мешает анализу; при концентрации выше 10^{-3} *М* глюкоза, диоксиацетон и глицеринальдегид реагируют медленно.

Точность метода около 3%.

Относительно получения препарата инозитдегидрогеназы см. [13]. Другие ферментные методы определения миоинозита [14] дают менее воспроизводимые результаты.

М. Гарсиа-Бунуэл и Р. Гарсиа-Бунуэл [15] предложили ферментный метод определения свободного миоинозита в спинномозговой жидкости и плазме крови человека. Плазму и СМЖ подвергают ультрафильтрации (центрифугирование в диализационном мешочке). Для удаления примесей, мешающих определению, исследуемый материал нагревают с гидроксиламином в кислой среде. Для определения содержания миоинозита раствор инкубируют с миоинозитдегидрогеназой и НАД. Количество образующегося НАД-H_2 определяют флуорометрически. Флуоресценция пропорциональна содержанию миоинозита в интервале концентраций миоинозита 0,025—0,4 *мкм* (0,45—7,2 *мг%*). Выход миоинозита 97,2—101%.

В плазме крови здоровых людей найдено 1,09 *мг%* миоинозита, в СМЖ 2,55 *мг%*. Метод пока не проверен другими лабораториями.

Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

Определение *D*-сорбита [1, 17]

Принцип. Сорбитдегидрогеназа [1] (кетозоредуктаза из печени млекопитающих) катализирует обратимое окисление сорбита в *D*-фруктозу с никотинамидадениндинуклеотидом (НАД) в качестве акцептора водорода:

$$\text{сорбит} + \text{НАД}^+ \rightleftarrows D\text{-фруктоза} + \text{НАД-Н} + \text{H}^+;$$

при pH=0 константа равновесия составляет:

$$K = \frac{(D\text{-фруктоза})\cdot(\text{НАД-Н})}{(\text{сорбит})\cdot(\text{НАД})} = 3{,}3\cdot 10^{-9}.$$

При избытке НАД и pH 9,5 сорбит количественно окисляется и образуется стехиометрическое количество НАД-H_2. Измеряется увеличение экстинкции НАД-H_2 при 340 *ммк*.

Реактивы (все растворы изготовляют на свежедеионизованной и дистиллированной в стекле воде; стеклянные сосуды стерилизуют, чтобы уничтожить рост микроорганизмов): 1) пирофосфатный буферный раствор (0,1 *М*, pH 9,5): 44,6 *г* $Na_4P_2O_7\cdot 10H_2O$ растворяют в 800 *мл* дистиллированной воды, приводят к pH 9,5 посредством примерно 10 н. раствора HCl (измерение значения pH проводят при 25° на стеклянном электроде) и доливают дистиллированной водой до 1000 *мл*; 2) трис-HCl, буферный раствор (0,01 *М* трис; pH 7,4): 0,121 *г* трис-гидроксиметиламинометана растворяют в 50 *мл* дистиллированной воды, значение pH доводят до 7,4 посредством примерно 8,5 *мл* 1 н. раствора HCl, доливают дистиллированной водой до 100 *мл*; 3) никотинамидадениндинуклеотид (около $2\cdot 10^{-2}$ *М* раствор НАД): 150 *мг* НАД растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 10 *мл*; 4) сорбитдегидрогеназа (15 000 *ед/мл*): препарат фермента растворяют в трис-HCl буферном растворе.

Буферный раствор пирофосфата может храниться по меньшей мере 3 недели при 25°. Растворы НАД и фермента сохраняют замороженными при —20°. Раствор фермента сохраняется так два месяца. Потеря активности вследствие повторного оттаивания и замораживания значительная.

Техника. *Подготовка исследуемого материала*. Пробы ткани гомогенизируют с 5—10 объемными частями ледяной 5%-ной (в/о) трихлоруксусной кислоты или 6%-ного раствора (в/в) хлорной кислоты. Белки отцентрифуговывают. Если применяют хлорную

---

[1] КФ 1.1.1.1. 1.1.1.2.

кислоту, то надосадочную жидкость доводят до pH около 3,5 посредством 0,5 *M* раствора $KHCO_3$ при температуре ледяной бани; осажденный хлорат калия отцентрифуговывают при 2 . Исследуемый материал можно очистить от белков также и гомогенизацией с 10 частями по объему 66%-ного алкоголя. Центрифугируют, осадок промывают четырехкратным объемом 66%-ного этанола, из соединенных экстратов отгоняют в вакууме алкоголь. Остаток экстрагируют трижды хлороформом, каждый раз с двойным объемом хлороформа, водную фазу освобождают от остаточного хлороформа продуванием азотом.

Внеклеточные жидкости (кровь, сперма) освобождают от белков добавлением эквимолярных количеств $ZnSO_4$ и $Ba(OH)_2$ или 5 *мл* спермы диализуют 48 час. при 4° против 100 *мл* дистиллированной воды при помешивании. Диализат лиофилизируют, остаток разводят в небольшом количестве воды. Очищенные от белков пробы освобождают от ионов на колонке ионитов (смесь из сильнокислого и сильнощелочного ионита; применяют, например, амберлит МВ-1 или Ag 501×8 (20—50 меш)[1]. Ионит загружают в цилиндрическую колонку и хорошо промывают дистиллированной водой. Очищенный от белка раствор пропускают через цилиндр и затем промывают по меньшей мере двойным объемом дистиллированной воды. Элюат должен стать полностью деионизированным (проверить проводимость), затем его конденсируют в вакууме.

Постановка опыта. Чтобы прошло полное окисление сорбита, первоначальное содержание его в пробе опыта должно быть небольшим по сравнению с начальным содержанием НАД (НАД: сорбит $>$ 10; от 0,02 до 0,20 *мкмоля* сорбита на пробу опыта). Предварительными опытами устанавливают, как сильно следует развести экстракт, очищенный от белков и деионизированный, чтобы в 1,00 *мл* содержалось 0,02—0,20 *мкмоля* сорбита.

Измерение ведут при 340 *ммк*. Толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 3,00 *мл*. Измерение проводят против сравнительной кюветы.

Последовательно отмеривают пипеткой: в кювету опыта — 1,00 *мл* буферного раствора (1), 0,20 *мл* раствора НАД (3), 0,75 *мл* дистиллированной воды, 1,00 *мл* пробы, очищенной от белков и деионизированной; в сравнительную кювету — 1,00 *мл* буферного раствора (1), 0,20 *мл* раствора НАД (3), 1,75 *мл* дистиллированной воды.

Два раза через каждые 3 мин. измеряют экстинкцию E, затем в обе кюветы вносят, помешивая, 0,05 *мл* раствора фермента (4). Экстинкцию измеряют каждые 3 мин., постоянное конечное значение — E_2.

Вычисление. Очищенная от белков и деионизированная проба может содержать соединения, абсорбирующие свет при длине вол-

[1] Детали см. S. Wolfson a. Williams-Asham. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1958, 99, 761.

ны 340 *ммк*. В этом случае E_1 поправляют на разведение, вызванное добавлением раствора фермента (ср. стр. 388):

$$\Delta E = E_2 - 0{,}983 \cdot E_1.$$

(0,983—поправка на разведение).

При $\varepsilon_{НАД} = 6{,}22$ *см²/мкмоль* (при 340 *ммк*) и для 3 *мл* объема пробы опыта получают:

$$\frac{\Delta E \cdot 3}{6{,}22} = \text{мкмоли сорбита/пробу опыта.}$$

Чтобы вычислить содержание сорбита в материале исследования, полученную цифру следует умножить на факторы разведения для осаждения белков и деионизации.

Пример. Проба ткани была настолько разведена при осаждении белков и деионизации, что 1,00 *мл* экстракта соответствовал 0,2 *г* ткани (сырой вес) — фактор разведения 5. Протокол опыта: 0 мин. $E_1 = 0{,}082$; 3 мин. $E_1 = 0{,}082$; добавление сорбитдегидрогеназы: 0 мин. $E_2 = 0{,}120$; 6 мин. $E_2 = 0{,}201$; 48 мин. $E_2 = 0{,}275$; 73 мин. $E_2 = 0{,}274$.

$$\Delta E = 0{,}275 - 0{,}983 \cdot 0{,}082 = 0{,}194;$$

$$\frac{0{,}194 \cdot 3}{6{,}22}\ 0{,}0936 \text{ мкмолей/пробу опыта}$$

$$\text{или } 0{,}0936 \cdot 5 \cdot 100 = 46 \text{ мкмолей сорбита на 100 г ткани.}$$

Источники ошибок. 1. Если очищенный от белка и деионизированный экстракт мутный, необходим еще один контрольный опыт, содержащий все составные части пробы опыта, кроме НАД-H_2. Если экстракт материала исследования содержит в большом количестве свободные кетозы (например, *D*-аллюлозу, *D*-седогептулозу, *D*-фруктозу, *L*-сорбозу, *D*-ксилозу, *D*-рибулозу, *L*-эритрулозу) то, это может привести к повторному окислению НАД-H_2. В животной ткани большинство названных кетоз едва ли встречается в свободном виде в большом количестве (исключение составляют мужские половые железы, семенная плазма и кровь зародыша опытных животных, которые содержат *D*-фруктозу). В этом случае анализируемый экстракт исследуют на содержание свободных кетоз [1], *D*-фруктозу можно удалить посредством инкубации с забродившими дрожжами [2]. После этого экстракт еще раз очищают от белков и деионизируют (см. стр. 388, сноска).

Сорбитдегидрогеназа катализирует также окисление *L*-идита, ксилита, *D*-глицеро-*D*-глюкогептита, рибита, аллита и *L*-треита. Константы равновесия окисления этих соединений колеблются в

---

[1] Например, методом Z. Dische a. E. Borenfreund. J. Biol. Chem., 1951, **192**, 583.

[2] T. Mann. Bioch. J., 1946, **40**, 481.

зависимости от длины цепи. Циклические полиалкоголи, например мезоинозит, не окисляются. Сорбит может быть идентифицирован хроматографическим отделением и превращением в свой гексацетат.

Точность метода 1,5%.

Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Lundquist F.* Bioch. J., 1958, **68**, 172.
2. *Holzer H.* et al. Bioch. Z., 1955, **326**, 385.
3. *Backer E.* В кн. Colowick S. a. Kaplan N.: Methods in Enzymology, N. 1, 1957, v. III, p. 295.
4. *Holzer H.* et al. Bioch. Z., 1955, **327**, 245.
5. *Holzer H.* a. *Goedde H.* Bioch. Bioph. Acta, 1960, **40**, 297.
6. *Lundquist F.* a. *Wolthers H.* Acta pharmacol. toxicol., 1958, **14**, 265.
7. *Racker E.* J. Biol. Chem., 1950, **184**, 313.
8. *Laurell S.* a. *Tibbling G.* Clin. Chim. Acta, 1966, **13**, 317.
9. *Croytu F.* Clin. Chem., 1965, **3**, 427.
10. *Wieland O.* В кн. Bergmeyer H. Methoden der enzymatischen Analyse. Weinheim, 1962, стр. 211.
11. *Klotzsch H.* a. *Bergmeyer H.* В кн. Bergmeyer H. см. [10], стр. 183.
12. *Tsao M.* a. *Schwartz E.* Anal. Bioch., 1962., **3**, 448.
13. *Weissbach A.* Bioch. Bioph. Acta, 1958, **27**, 608.
14. *Charalampous F.* a. *Abrahams P.* J. Biol. Chem., 1956, **225**, 575.
15. *Garcia-Bunuel M.* a. *Garcia-Bunuel R.* J. Lipid Res., 1964, **5**, 184.
16. *Williams-Ashman H.* et al. Arch. Bioch. Bioph., 1957, **72**, 485.
17. *Wolfson S.* a. *Williams-Aschman H.* Proc. Soc. Exptl Biol. Med., 1958, **99**, 761.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИПИДОВ

Определение лецитина [1]

П р и н ц и п. Лецитиназа (фосфолипаза) *D* катализирует гидролитическое отщепление холина от молекулы лецитина:

$$\text{лецитин} + H_2O \rightarrow \text{фосфатидная кислота} + \text{холин}. \quad (1)$$

Реакция активируется Ca^{2+} и эфиром. Она протекает полностью слева направо. Лецитин и фосфатидная кислота легко растворимы в эфире, а холин нет.

Можно после ферментативного гидролиза посредством взбалтывания с эфиром отделить холин и осадить в водной фазе в виде рейнеката. Красновато-фиолетовый холинрейнекат растворяется в ацетоне, его концентрация измеряется колориметрически при 520 *ммк*.

Лецитиназа *D*, выделенная из белой капусты [1], является относительно сырым препаратом; однако он не содержит ферментов, разрушающих холин. Фермент проявляет специфическую активность около 0,5 *ед/мг* сухого веса.

Р е а к т и в ы (приблизительно для 20 определений): 1) ацетатный буферный раствор (0,1 *М*; pH 5,6): 4,8 *мл* 0,1 *М* раствора уксусной кислоты (5,8 *мл* ледяной уксусной кислоты разбавляют бидистиллированной водой до 1000 *мл*) и 45,2 *мл* 0,1 *М* раствора ацетата натрия доливают бидистиллированной водой до 1000 *мл*; 2) хлорид кальция (1 *М*): 14,7 *г* $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ растворяют в бидистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*; 3) раствор рейнеката (3% в/о): 600 *мг* соли Рейнеке растворяют в метаноле и доводят объем до 20 *мл*; 4) стандартный раствор холинхлорида (2% в/о): 2 *г* холинхлорида растворяют в бидистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*. Содержание холинхлорида в растворе определяют титрованием раствором нитрата серебра (образование AgCl); 5) трихлоруксусная кислота (3 *М*): 490 *г* трихлоруксусной кислоты растворяют в бидистиллированной воде и доводят объем до 1000 *мл*; 6) лецитиназа *D*[2] (около 20 *мг* белка на 1 *мл*); 400 *мг* лецитиназы суспендируют посредством ацетатного буферного раствора (1) и доводят объем до 20 *мл*. Применяют мутную взвесь фермента.

Взвесь фермента сохраняют при 0° и ежедневно готовят свежую так как она быстро теряет активность. Раствор рейнеката ежедневно

---

[1] См. C. C a s s o n a. F. G r i f f i n. Analyst, 1961, 86, 544.

[2] КФ 3.1.4.4.

готовят свежим. Все остальные реактивы сохраняются при комнатной температуре неограниченное время. Однако необходимо следить, чтобы в них не происходило размножение микроорганизмов.

Техника. *Подготовка исследуемого материала.* Продукты питания, содержащие много лецитина (например, яйца, яичные продукты, молочный порошок, бобы сои, майонез), анализируют без предварительной обработки. В каждой пробе определяют сухой вес.

Продукты питания с небольшим содержанием лецитина (например, лапша, яичный крем, торты, пирожные) экстрагируют эфиром в аппарате Сокслета; при этом весь лецитин извлекается в эфирный слой, его и анализируют.

Растительные масла и жиры растворяют в эфире, из эфирного экстракта осаждают лецитин ацетоном (с добавлением насыщенного раствора $MgCl_2$ до полного осаждения). Осадок растворяют в эфире, раствор анализируют.

Ткани животных, кровь, плазму и сыворотку экстрагируют смесями этанол + эфир, петролейный эфир + хлороформ или горячей смесью хлороформ + метанол [1]. Растворители выпаривают, остаток разводят эфиром.

Постановка опыта. К каждому определению ставят опыт без фермента: он дает содержание холина в пробе, а основной спыт показывает сумму холин + лецитин.

В оба опыта вносят либо твердый, тонко измельченный в порошок исследуемый материал и 10 *мл* эфира, либо раствор пробы в эфире (эфирный экстракт).

Ферментативная реакция. Последовательно отмеривают пипеткой в мерные колбочки емкостью 100 *мл*:

Основной опыт	Пустой опыт
10,0 *мл* ацетатного буферного раствора (1)	11,0 *мл* ацетатного буферного раствора (1)
0,1 *мл* раствора $CaCl_2$ (2)	0,1 *мл* $CaCl_2$ (2)
1,0 *мл* взвеси фермента (4)	—
10,0 *мл* эфирной вытяжки пробы	10,0 *мл* эфирной вытяжки пробы
или	или
10,0 *мл* эфира и твердой пробы (соответственно 5—50 *мг* лецитина)	10,0 *мл* эфира твердой пробы (соответственно 5—50 *мг* лецитина).

На аппарате для взбалтывания встряхивают интенсивно при комнатной температуре по меньшей мере 3 часа. Затем в каждую колбу отмеряют пипеткой 1,00 *мл* трихлоруксусной кислоты (5), перемешивают, сливают эфирную фазу и выбрасывают, водную фазу взбалтывают два раза с 50 *мл* эфира каждый раз, эфирные фазы сливают и выбрасывают, водную фазу фильтруют; фильтрат анализируют.

---

[1] Детали см. R. Sinclair. J. Biol. Chem., 1948, 174, 343.

Колориметрическое измерение. Измерение ведут при 520 *ммк* в кварцевых или стеклянных кюветах. Толщина слоя 1 *см*, температура комнатная. Измерение ведут против чистого ацетона.

В конические центрифужные пробирки отмеряют пипеткой 20 *мл* фильтрата и 1,0 *мл* раствора рейнеката (3) и оставляют в покое 3 часа в ледяной бане. Холинрейнекат (красные кристаллические чешуйки) отцентрифуговывают. Осадок промывают дважды 3 *мл* бидистиллированной воды 0° каждый раз, осадок растворяют в 3,0 *мл* ацетона (холинрейнекат должен полностью перейти в раствор), отцентрифуговывают, прозрачную надосадочную жидкость сливают в кювету и измеряют экстинкцию.

Калибровочная кривая. В мерные колбы емкостью 100 *мл* вливают 10,0 *мл* ацетатного буферного раствора (1), 0,1 *мл* $CaCl_2$ (2), 10,0 *мл* эфира, 0,1—0,4 *мл* стандартного раствора холина (4), 0,8—0,5 *мл* воды, 1,0 *мл* трихлоруксусной кислоты (5). Хорошо перемешивают. Два раза взбалтывают с 50 *мл* эфира каждый раз, эфирные фазы выбрасывают, водные фазы фильтруют. Колориметрическое измерение проводят, как описано выше — строят кривую по точкам, полученным при нанесении величины экстинкции (ордината) против *мг* холина (абсцисса). Внесенные количества холина составляют 2; 4; 6 и 8 *мг* на опыт.

Калибровочная кривая пересекает абсциссу не на нуле, а около 0,1 *мг* холина вследствие неполного осаждения холинрейнеката и промываний водой. Тем не менее она хорошо воспроизводима.

Вычисление. Экстинкция пустого опыта (без фермента) показывает свободный холин пробы, экстинкция основного опыта (с ферментом) — свободный холин + холин пробы, полученный в результате ферментативной реакции. Из разницы экстинкций ΔE вычисляется содержание лецитина.

Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

Точность метода около 3%.

Методы определения полиненасыщенных жирных кислот см. стр. 220, а также [2], глицерина — стр. 378.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Davidson F.* a. *Long C.* Bioch. J., 1958, **69**, 458; *Casson C.* a. *Griffin F.* Bioch. J., 1961, **86**, 544.
2. *Sullman H.* Klin. Wochenchr., 1960, **39**, 386.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГОРМОНОВ [1]

Гидролиз конъюгатов стероидов

Метаболиты стероидных гормонов появляются в моче почти исключительно в виде растворимых в воде коньюгатов. Соединения ряда $3\beta - \Delta^5$ или 5α выделяются преимущественно как сульфаты, остальные как β-глюкозидносвязанные глюкурониды. Имеются, однако, исключения, например андростерон выделяется до 80% в качестве сульфата, эстриол — в качестве глюкуронида, эстрон и эстрадиол — наряду с этим также и в виде сульфата. Механизм переноса сульфата и глюкуронида может считаться выясненным. Вопрос о том, имеются ли другие формы коньюгации, еще не решен. Данные последнего времени говорят о такой возможности.

Для определения стероиды следует перевести в свободные алкоголи. Ферментативный гидролиз приобретает все возрастающее значение вследствие его мягкого и специфического воздействия.

Принцип. Стероидные гидролазы (β-глюкуронидазы [2], фосфатазы [3], сульфатазы [4]) катализируют расщепление конъюгатов стероидов на стероидный алкоголь и кислоту:

$$\text{конъюгат} + H_2O \rightleftarrows \text{стероид. алкоголь} + \text{кислота.}$$

При условиях, описанных ниже, равновесие реакции находится далеко на правой стороне. Если анализируется биологический материал, то определяют стероидный спирт, в чистых же растворах и экстрактах может быть определена и выделенная в свободном виде кислота.

Гидролиз стероидных глюкуронидов

Со времени открытия β-глюкуронидазы ферментативный гидролиз стероидных глюкуронидов нашел широкое распространение. Препараты β-глюкуронидазы получают из печени млекопитающих или из Escherichia coli [5]. Они отличаются по оптимуму pH, а также, вероятно, и по специфичности к субстрату. Несмотря на это, ре-

---

[1] Сокращенное описание см. [1,2]; описание других ферментных методов определения гормонов — [3].
[2] КФ 3.2.1.31.
[3] См. щелочная фосфатаза КФ 3.1.3.1; кислая КФ 3.1.3.2.
[4] КФ 3.1.6.2
[5] K. Dodgson a. B. Spencer. Bioch. J., 1953, 55, 315.

зультаты анализов, выполненных при помощи обоих препаратов, обычно хорошо совпадают, что позволяет дать общее описание методики.

Активность β-глюкуронидазы приводится в единицах Фишмана [1]. Она колеблется в продажных препаратах между 100 и 1000 *ед/мг* белка.

Загрязнение фосфатазой и сульфатазой, которые могут исказить результаты опыта с неизвестными стероидными коньюгатами, не должно быть больше 0,01% (по отношению к специфической активности глюкуронидазы). Другие свойства β-глюкуронидазы см. стр. 393. Относительно очистки перпарата см. [1].

Р е а к т и в ы. Буферные растворы и их разведения готовят на свеже перегнанной бидистиллированной воде: 1) ацетатный буферный раствор (0,1 *М*, pH 4,62): а) 13,61 *г* ацетата натрия · $3H_2O$ растворяют в бидистиллированной воде и объем доводят до 1000 *мл*; б) 6,00 *мл* уксусной кислоты разводят бидистиллированной водой до 1000 *мл*. Растворы *а* и *б* смешивают в объемных отношениях 1 : 1; 2) трис-буферный раствор (0,3 *М*, pH 6,5): 36,3 *г* трис-оксиметиламинометана растворяют в 100 *мл* бидистиллированной воды и устанавливают pH 6,5 добавлением по каплям концентрированной уксусной кислоты. Доливают бидистиллированной водой до 1000 *мл*; 3) β-глюкуронидаза (250 *ед/мл*): продажные препараты растворяют или разводят соответственно ацетатным буферным раствором (1) или, при наличии глюкуронидазы Sigma, трис-буферным раствором (2); 4) водный раствор NaOH (1,0н.).

Раствор фермента сохраняют закупоренным при 4°. Он сохраняется 3—4 недели. Растворы глюкуронидазы для определений в крови готовят для каждого опыта заново. Рост бактерий и грибков делает реактивы непригодными.

Т е х н и к а. *Подготовка исследуемого материала*. Мочу обрабатывают по возможности свежей. Пациенты не должны получать медикаментов и в период собирания мочи должны сохранять постельный режим. Для определения стероидов в плазме требуется 60—80 *мл* крови из перетянутой V. cubitalis. Стенки шприца и сосуда для принятия крови смачивают 0,5 *мл* раствора гепарина (5000 ед. гепарина на 1 *мл*). Форменные элементы отцентрифуговывают не позднее чем через 30 мин. после взятия крови. Содержание стероидов в прозрачной, свободной от гемолиза плазме не изменяется при хранении на холоду при 4° в течение суток. Если анализ можно сделать только через несколько дней, то плазму сохраняют замороженной при *t* от —16 до —20°.

Экстракция и удаление белков. Мочу кипятят не более 3 мин., чтобы инактивировать ингибиторы фермента.

При анализе плазмы, если определяют только содержание свободных или общих стероидов, достаточно 30 мин. нагревания до 60°.

---

[1] 1 единица Фишмана — это такое количество фермента, которое за 1 час. при 37° выделяет из фенолфталеинглюкуронида 1 *мкг* фенолфталеина.

Для раздельного определения свободных и конъюгированных стероидов свободные стероиды должны быть экстрагированы, а вслед за этим должны быть осаждены белки из плазмы. Ход обработки при этом одинаков, независимо от того, определяют ли сульфаты, глюкурониды и фосфаты или стероиды C_{21} и C_{19}.

Свободные стероиды экстрагируют 2 раза каждый раз тремя объемными частями хлороформа [1]. Водная фаза содержит стероидные конъюгаты. Для осаждения из нее белков добавляют 5-кратный объем 96%-ного этанола и перемешивают покачиванием, затем нагревают на водяной бане до 40°. Отстаивают 24 часа при 4°. Надосадочную жидкость отфильтровывают в круглодонную колбу, осадок промывают дважды 50 *мл* 96%-ного спирта и отцентрифуговывают. Спиртовые экстракты соединяют, алкоголь отгоняют в вакууме, водный остаток взбалтывают 2 раза со 100 *мл* эфира каждый раз, чтобы удалить липоиды. Эфир выбрасывают, водный слой освобождают на водяной бане (не выше 50°) от растворенного эфира, смешивают с этанолом до 70% и промывают 2 раза 100 *мл* каждый раз специальным бензином (авиационный бензин), взбалтывают с 70%-ным этанолом до насыщения им). Бензиновую фазу выбрасывают. Алкоголь отгоняют в вакууме. Остаток должен быть свободным от алкоголя. Практически для этого достаточно сгущения объема до 4—5 *мл* (при обработке 10 *мл* исходной плазмы).

Ферментативный гидролиз. Моча: к 4 *мл* свежей (прокипяченной) мочи в закупоренных центрифужных пробирках емкостью 50 *мл* добавляют 16 *мл* раствора глюкуронидазы (3) и инкубируют 48 час. при 37° (термостат). Освободившиеся стероидные спирты дважды экстрагируют 25 *мл* хлороформа (каждый раз) в центрифужных пробирках; хлороформ отсасывают стеклянным шприцем емкостью 50 *мл* с длинной тупой стальной канюлей. Объединенные хлороформные фазы промывают 4 *мл* 1,0 н. раствора NaOH (4), водную фазу выбрасывают, хлороформенную фазу применяют для определения стероидов.

Плазма: для гидролиза 100 *мл* плазмы нужны 62 500 единиц β-глюкуронидазы. Так как 60—80 *мл* крови дают 25—26 *мл* плазмы, применяют 16 625—21 875 единиц.

В закупоривающиеся центрифужные пробирки, содержащие 4 *мл* очищенного от белка экстракта, вливают 12 *мл* ацетатного буферного раствора (1) или трис-буферного раствора (2), затем добавляют 67 *мл* раствора глюкуронидазы (3), перемешивают опрокидывая, и в продолжение 48 час. инкубируют в термостате при 37°. Полученные в свободном виде стероидные алкоголи дважды экстрагируют в делительной воронке эфиром (свободным от перекиси) 150 *мл* каждый раз. Соединенные эфирные фазы промывают 3 раза 5 *мл* 0,1н. раствора NaOH каждый раз и вслед за этим 3 раза 5 *мл* бидистиллированной воды. Опытную эфирную фазу выпаривают на паровой

[1] Если необходима по возможности полная экстракция C_{21}-стероида, то дополнительно два раза экстрагируют этилацетатом, а C_{19}-стероида — дополнительно бензолом (тремя объемами каждый раз).

бане досуха (учитывать опасность взрыва!). Остаток применяют для определения стероидов.

Источники ошибок. Если проводят количественное определение свободных и конъюгированных стероидов, то биологический материал следует обработать немедленно после отбора пробы. Самопроизвольное омыление под влиянием эндогенных (глюкуронидаза плазмы) или экзогенных (рост бактерий) факторов и потери стероидов вследствие абсорбции эритроцитами могут исказить результаты.

Лекарства, принимаемые больными, а также средства, консервирующие кровь и мочу, могут вызвать осложнения при анализе (ингибиторы, нарушения определения стероидов).

До настоящего времени очень мало исследован вопрос о том, гидролизуют ли глюкуронидазы различного происхождения все стероидные глюкурониды в одинаковой степени. Имеющиеся данные допускают следующие заключения:

1. Расположение группы OH при C_3 не играет роли для гидролиза глюкуронидазой из печени рогатого скота. Для действия фермента имеет значение положение группы OH, связанной с глюкуроновой кислотой на кольцевом скелете или боковой цепи.

2. Глюкуронидазы из печени рогатого скота и из бактерий с различной быстротой гидролизуют чистые стероидные глюкурониды. Инкубация мочи с обоими ферментами также приводит к различным результатам в отношении количества освобожденного стероида и освобожденной стероидной кислоты.

3. Активность глюкуронидаз в отношении фенолфталеинглюкуронида не всегда согласуется с активностью в отношении стероидных глюкуронидов. Поэтому целесообразно работать постоянно с большим избытком фермента и при более продолжительной инкубации.

Гидролиз стероидных сульфатов

Гидролиз стероидных сульфатов при помощи стероидной сульфатазы из пищеварительного тракта моллюсков и из печени млекопитающих до настоящего времени применялся лишь изредка. С этим ферментом довольно трудно работать (до сих пор не удавалось изготовить растворимые препараты фермента), и он обладает высокой стерической специфичностью: расщепляет исключительно 3β-сульфаты Δ^5- и 5α-ряда, так же как и сульфаты эстрогена.

Возможность осуществить специфический гидролиз этим ферментом также и сложного эфира серной кислоты Δ^5-андростен-3β-ол-17-она (дегидроизоандростерона), определение уровня которого представляет клинический интерес при различных эндокринопатиях, практически еще не использовалась.

Единицей считается количество фермента, которое освобождает в час при 37° при постоянном встряхивании 1 *мкг* Δ^5-андростен-3β-ол-17-она из его сложного эфира серной кислоты. Загрязнения

β-глюкуронидазой или фосфатазой, которые могут исказить результаты, не должны превосходить 1% (относительно специфической активности сульфатазы).

Реактивы: 1) буферный раствор триэтаноламина (0,5 *М*, pH 7,3): 92,5 *г* триэтаноламин-гидрохлорида растворяют в 500 *мл* дистиллированной воды, устанавливают ледяной уксусной кислотой pH равным 7,3, доливают дистиллированной водой до 1000 *мл*; 2) стероидная сульфатаза (200 *мг* белка на 1 *мл* = 200 *ед/мл*): 2 *г* стероидной сульфатазы при сильном помешивании доливают буферным раствором (1) до 10 *мл* [1].

Ввиду нерастворимости препарата фермента образуется взвесь, которую следует взбалтывать перед употреблением.

Ферментная взвесь сохраняется при 4° 3—4 недели. Буферный раствор пригоден до тех пор, пока он стерилен.

Техника. *Подготовка исследуемого материала* (см. стр. 394).

Экстрагирование и удаление белков. Моча: 24-часовую мочу сгущают в вакууме до 400—500 *мл*; доводят pH посредством 4н. H_2SO_4 до 2,5—3,0 (индикаторная бумага). В экстракционном аппарате Кутшера — Штойделя экстрагируют в течение 16 час. 0,5 объемами *н*-бутанола [2].

Бутаноловый экстракт промывают 4 раза ($^1/_{10}$ его объема каждый раз) дистиллированной водой с прибавлением небольшого количества поваренной соли. Бутанол выпаривают в вакууме (температура < 50°).

Ферментативный гидролиз. Экстракт из плазмы или мочи растворяют в 100—200 *мл* буферного раствора триэтаноламина (1), добавляют 1—2,5 *мл* (200—500 единиц) взвеси стероидной сульфатазы (2), инкубируют 17 час. при 37° (термостат), помешивая при этом, чтобы фермент не осаждался, добавляют 300—600 *мл* этанола (промытого в делительной воронке бензолом), центрифугируют 15 мин. при 1000—2000 *g*, осадок промывают три раза, каждый раз 50 *мл* такого же этанола. Надосадочную жидкость и промывные растворы соединяют и выпаривают в вакууме досуха. Остаток применяют для определения стероидов.

Стероидная сульфатаза обладает высокой стерической специфичностью. Она отличается в этом отношении от обнаруженной также в микросомах печени арилсульфатазы [3]. Эта специфичность ограничивает применение стероидной сульфатазы для гидролиза стероидных сульфатов в биологическом материале.

---

[1] Получение см. K. Dodgson. Bioch. J., 1953, **55**, 315. КФ 3.1.6.2.

[2] Конъюгаты стероидов можно также экстрагировать по A. Kellie a. A. Wade. Bioch. J., 1957, **66**, 196: мочу насыщают сульфатом аммония до 50% и встряхивают три раза с 2 обьемами эфира/алкоголя (3 : 1) каждый раз. Эфиро алкогольный экстракт выпаривают досуха, остаток дальше очищают распределением между специальным бензином Шелл и 70% ным алкоголем.

[3] W. Fishman a. S. Green. J. Biol. Chem., 1955, **215**, 527. КФ 3.1.6.1.

Гидролиз стероидных фосфатов

Стероидные фосфаты были недавно обнаружены в крови человека. Пропись для их гидролиза см. ниже, стр. 404.

Гидролиз конъюгатов стероидов и определение свободной кислоты, полученной в результате гидролиза

Глюкурониды

П р и н ц и п. Метод основывается на реакции окрашивания Фишмана и Грина. Сложный эфир глюкуроновой кислоты, глюкурониды, свободная глюкуроновая кислота и другие альдегиды, особенно гексозы, реагируют с нафторезорцином (1,3-дигидроксинафталин) с окрашиванием в голубой цвет. После обработки пробы гипойодитом при щелочном значении pH (окисление всех свободных альдегидных групп) реакцию окрашивания дают только глюкуроновые альдегиды. Таким образом измеряют интенсивность окрашивания не обработанной β-глюкуронидазой и «окисленной пробы» против ферментативногидролизированной и, вслед за тем «окисленной пробы». Разница соответствует содержанию в пробе стероидных глюкуронидов, поскольку другие глюкурониды, расщепляющиеся этим ферментом, не встречаются.

Р е а к т и в ы: 1) ацетатный буферный раствор (0,1 *М*, pH 4,62) — см. стр. 394. Гидролиз стероидных глюкуронидов. 2) буферный раствор карбоната (0,44 *М*, pH 10,1): 8,4 *г* $NaHCO_3$ и 36,0 *г* Na_2CO_3 растворяют в бидистиллированной воде, объем доводят до 1000 *мл*; 3) раствор йода + йодистый калий: 1,666 *г* KJ растворяют в бидистиллированной воде, при осторожном нагревании вносят 1,291 *г* йода. После полного растворения доливают бидистиллированной водой до 100 *мл*; 4) серная кислота (18 н.) :один объем концентрированной H_2SO_4 вливают осторожно тонкой струей в равный объем бидистиллированной воды; 5) серная кислота (6н.): раствор 4 разбавляют в три раза бидистиллированной водой; 6) раствор нафторезорцина (0,4% в/о): нафторезорцин тонко размельчают в ступке, 400 *мг* суспендируют в 100 *мл* бидистиллированной воды, 10 мин. сильно встряхивают, фильтруют. Раствор хранят в темной бутыли; 7) бисульфит натрия (1 *М*): 19,01 *г* $Na_2S_2O_5$ растворяют в бидистиллированной воде до 100 *мл*; 8) стандартный раствор глюкуронида (10^{-2} *М*): 51,6 *мг* фенолфталеинглюкуронида или 8,6 *мг* 8-оксихинолинглюкуронида растворяют в бидистиллированной воде, объем доводят до 10 *мл*; 9) β-глюкуронидаза (1000 *ед/мл*) — см. «Реактивы», стр. 395: продажные препараты растворяют или разводят соответственным образом ацетатным буферным раствором (1). Раствор нафторезорцина готовят заново для каждой серии опытов. Раствор $Na_2S_2O_5$ обновляют каждую неделю. Раствор фермента сохраняют закупоренным при 4°. Он сохраняется 3—4 недели. Все остальные реактивы практически сохраняются неограниченное время.

Техника. *Подготовка исследуемого материала*. Биологический материал экстрагируют и освобождают от белков (см. стр. 394 и дальше). По [1][1] требуется дальнейшая очистка посредством распределения между растворителями или колоночной хроматографией, чтобы получить возможно чистые экстракты. Большие количества не стероидных глюкуронидов могут привести к значительным ошибкам.

Постановка опыта. Сначала проверяют весь ход анализа на опытной смеси, содержащей 0,1 *мл* стандартного раствора глюкуронида (8) вместо пробы.

Ферментативная реакция и окисление. Отмеривают пипеткой в три пробирки: 1) 2,5 *мл* буферного раствора ацетата (1); 0,2 *мл* раствора пробы; 0,25 *мл* раствора β-глюкуронидазы (9), бидистиллированной воды до 5 *мл*. 2) Все растворы за исключением раствора β-глюкуронидазы (9). 3) Только 0,25 *мл* раствора глюкуронидазы (9). Содержимое пробирок хорошо перемешивают и инкубируют 24 часа в водяной бане при 37° (термостаты). Затем раствор из пробирки 2 вливают в раствор пробирки 3, обе оставшиеся пробирки тотчас помещают в ледяную воду, добавляют в каждую по 2,05 *мл* буферного раствора карбоната (2) и смешивают. В обе пробирки отмеривают пипеткой 1,50 *мл* раствора йода + йодистый калий (3), дают постоять 30 мин. в темноте закупоренными, добавляют 0,15 *мл* раствора $Na_2S_2O_5$ (7), взбалтывают, пока не исчезнет желтое окрашивание, в случае необходимости добавляют еще одну каплю раствора $N_2S_2O_5$ (7), далее вливают в обе пробирки по 0,30 *мл* 6н. раствора H_2SO_4 (5) и взбалтывают, пока не улетучится весь CO_2.

Реакция окрашивания. Измерение ведут при 578 *ммк* в кварцевых или стеклянных кюветах, толщина слоя 1 *см*. Измеряют против пустого опыта (состав такой же, как и в стандартной «смеси», но с бидистиллированной водой вместо стандартного раствора глюкуронида).

Стандартные растворы. Отмеряют пипеткой в пробирки: 0,01—0,1 *мл* (0,1—1,0 *мкмоль*) стандартного раствора глюкуронида (8), бидистиллированной воды до 5 *мл*, 2,05 *мл* буферного раствора карбоната (2), 1,50 *мл* раствора йода + йодистый калий (3), дают постоять 30 мин. в темноте закупоренными, затем добавляют 0,15 *мл* раствора $Na_2S_2O_5$ (8), встряхивают, пока не исчезнет желтая окраска, в случае необходимости добавляют еще каплю раствора $Na_2S_2O_5$ (7). Далее добавляют 0,30 *мл* 6н. раствора H_2SO_4 (5) и взбалтывают, пока не улетучится весь CO_2. Растворы анализируют так же, как основные смеси опыта.

Основные опытные смеси. Отмеряют пипеткой в колбу Эрленмейера емкостью 50 *мл* с притертой стеклянной пробкой: 4,0 *мл* «окисленных смесей» (см. выше), 2,0 *мл* 18н. раствора H_2SO_4 (4) и 2,0 *мл* раствора нафторезорцина (6), хорошо смешивают, без пробок ставят на 90 мин. в кипящую водяную баню (уровень воды в

[1] J. Schneider a. M. Lewbart. Recent Progress Hormone Res., 1959, 15, 201.

в бане должен быть выше уровня растворов в колбах). Затем 10 мин. охлаждают под водопроводным краном и добавляют 10,0 *мл* ледяного 95%-ного этанола, взбалтывают и вливают 8,0 *мл* толуола. Колбы закупоривают, через каждые 40 сек. сильно встряхивают, отстаивают для разделения смеси. Осторожно отсасывают пипеткой нижнюю водную фазу. Часть голубой толуоловой фазы сливают в кювету и измеряют экстинкцию при 578 *ммк* против пустого опыта.

Вычисление. Экстинкции калибровочных смесей наносят соответственно против *мкмолей* глюкуронида. По этой кривой определяют содержание глюкуронида в смесях главного опыта. Обычно 0,390 *мкмолей* глюкуронида в смеси в результате реакции окрашивания вызывают экстинкцию 1,0. Поэтому, вместо того чтобы вычертить калибровочную кривую, можно вычислить концентрацию глюкуронида в анализируемой смеси с достаточной точностью и таким способом:

$E \cdot 0{,}39 =$ *мкмолям* глюкуронида в опытной смеси для реакции окрашивания.

Для того чтобы получить *мкмоли* глюкуронида на 1 *мл* пробы, следует вычислять по следующей формуле:

$$(E_2 - E_1) \cdot 0{,}39 \cdot 5 \cdot 2{,}25 = \text{мкмолям глюкуронида/мл пробы},$$

где E_2 — экстинкция опытной смеси, не гидролизованной β-глюкуронидазой, E_1 — экстинкция опытной смеси, гидролизованной β-глюкуронидазой, 5 — перечисление 0,2 *мл* пробы в смеси для ферментативной реакции на 1,0 *мл*, 2,25 — перечисление 4 *мл* аликвоты, окисленной смеси опыта, примененной для реакции окрашивания, на 9 *мл* (= общему объему окисленной опытной смеси)

Пример. Анализировали 0,2 *мл* свежей вскипяченной мочи. После измерений получены следующие значения:

Проба 1 (после ферментативного гидролиза): $E_1 = 0{,}100$.

Проба 2 (без ферментативного гидролиза): $E_2 = 0{,}500$.

$$E_2 - E_1 = 0{,}4 \cdot 0{,}39 \cdot 5 \cdot 2{,}25 = 1{,}755 \text{ мкмоля глюкуронида на 1 мл мочи.}$$

Источники ошибок. Веществами, ингибирующими глюкуронидазы, являются сахаро-1,4-лактон, первичные алкоголи и стероиды, а также неизвестные факторы в крови и ткани. При большом избытке ингибируют также глюкуроновая кислота и γ-глюкуронолактон.

Смеси для реакции окрашивания нельзя оставлять стоять на прямом солнечном свете.

Гексозы и дисахариды в концентрациях выше $2 \cdot 10^{-4}$ *молей* мешают реакции окрашивания.

Сульфаты

Принцип. Метод основан на том, что свободные сульфаты осаждаются в кислом растворе ацетона с бензидином. Комплекс бензидинсульфата дает красное окрашивание с β-нафтохинонсуль-

фоновой кислотой, которое измеряют при 564 *ммк*. Разница в содержании свободного сульфата до и после ферментативного гидролиза дает количество сульфата, связанного со стероидами.

Реактивы: 1) стандартный раствор сульфата (10^{-2} *М*). 322,2 *мг* $Na_2SO_4 \cdot 10\ H_2O$ растворяют в бидистиллированной воде до 100 *мл*; 2) трихлоруксусная кислота (2*М*): 32,68 *г* трихлоруксусной кислоты растворяют в бидистиллированной воде до 100 *мл*; 3) раствор бензидина (1% в/о): 1 *г* бензидина растворяют в 100 *мл* ацетона; 4) раствор буры (1% в/о): 1 *г* $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ растворяют в 100 *мл* 0,1 н. раствора NaOH; 5) нафтохинонсульфоновая кислота (около $6 \cdot 10^{-3}$ *М*): 0,15 *г* соли натрия β-нафтохинонсульфоновой кислоты растворяют в 100 *мл* бидистиллированной воды; 6) трис-ацетатный буферный раствор (1 *М* трис, pH 7,3): 242 *г* трис-оксиметиламинометана растворяют в бидистиллированной воде до 1000 *мл*, 100 *мл* этого раствора разводят 30 *мл* H_2O и доводят pH посредством добавления каплями 96%-ной уксусной кислоты до 7,3 (стеклянный электрод). Доливают бидистиллированной водой до 200 *мл*; 7) стандартный раствор стероидного сульфата (10^{-2} *М*): 39,2 *мг* дегидроизоандростеронсульфата растворяют в бидистиллированной воде, объем доводят до 10 *мл*; 8) стероидная сульфатаза (200 *ед/мл*) [1]: продажный препарат суспендируют при сильном помешивании (следует избегать пены) в буферном растворе трис-ацетата (6). Стероидная сульфатаза нерастворима, взвесь перед каждым опытом следует хорошо перемешивать.

Раствор нафтохинонсульфоновой кислоты (5) следует изготовлять заново для каждого опыта. Раствор бензидина выбрасывают, когда он становится желтоватым. Взвесь фермента сохраняется 3—4 недели при 4°. Все остальные реактивы сохраняются практически неограниченное время при комнатной температуре.

Техника. *Подготовка материала исследования* см. стр. 395.

Постановка опыта. В первую очередь испытывают посредством опытной смеси, которая вместо пробы содержит 0,1 *мл* стандартного раствора стероидного сульфата (7), дает ли анализ воспроизводимые результаты.

Ферментативная реакция. Отмеряют пипеткой в 2 сосуда аппарата Варбурга: 1. 0,20 *мл* буферного раствора трис-ацетата (6); 0,10 *мл* пробы; 0,5 *мл* суспензии стероидной фосфатазы [2] (8) бидистиллированной воды до 1,00 *мл*. 2. Только 0,50 *мл* взвеси стероидной сульфатазы (8). 3. В пробирку отмеряют пипеткой все растворы смеси 1, за исключением стероидной сульфатазы.

Смеси 1 и 2 встряхивают в аппарате Варбурга при 37° в течение 16 час. Смесь, находящуюся в пробирке 3, держат в термостатированной водяной бане 16 час. при 37 °. Затем все растворы охлаждают в ледяной бане. Сливают вместе смеси 2 и 3, получая таким образом «раствор 2». К обоим растворам прибавляют 1,0 *мл* раствора три-

---

[1] 200 *мг* ферментного белка в 1 *мл*.
[2] Щелочная фосфатаза КФ 3.1.3.1; кислая фосфатаза 3.1.3.2.

хлоруксусной кислоты (2) и 2,0 *мл* бидистиллированной воды, перемешивают, центрифугируют растворы в конических центрифужных пробирках в течение 15 мин. при 1000—2000 g.

Не взмутив, берут по 2,0 *мл* прозрачной надосадочной жидкости для реакции окрашивания.

Реакция окрашивания. Измерение ведут при 546 *ммк*, толщина слоя 1 *см*. Измерение ведут против пустого опыта (состав: как калибровочные смеси, однако с бидистиллированной водой вместо стандартного сульфата).

Стандартные растворы. Отмеряют пипеткой в центрифужные пробирки с круглым дном: 0,01 до 0,10 *мл* стандартного раствора сульфата натрия (1), 1,49—1,40 *мл* бидистиллированной воды и 0,5 *мл* раствора трихлоруксусной кислоты (2), хорошо смешивают, анализируют так же, как и основной опыт.

Основной опыт. В центрифужные пробирки с круглым дном отмеряют пипеткой: 2,00 *мл* освобожденной от белка надосадочной жидкости или калибровочного раствора и 4,5 *мл* ледяного раствора бензидина (3); хорошо встряхивают и дают постоять точно 1 час на ледяной бане. Уровень жидкости в ледяной бане должен быть выше уровня растворов в пробирках. Затем 15 мин. центрифугируют при температуре 0—4° и 4000 *g*, прозрачную надосадочную жидкость сливают осторожно без потери осадка. Пробирки оставляют в покое 3 мин. в косом положении, отверстием вниз, чтобы могла слиться вся жидкость. Потом пробирки возвращают в ледяную баню и добавляют 7,0 *мл* ледяного ацетона и сильно встряхивают до тех пор, пока осадок не суспендируется равномерным образом. Центрифугируют 15 мин. при 0° и 4000 *g*. Надосадочную жидкость осторожно сливают без потери осадка. Пробирки оставляют в покое около 10 мин. отверстием вниз, пока остаток не будет сухим. Добавляют 0,50 *мл* раствора буры (4), осторожно нагревают над небольшим пламенем. После полного растворения остатка добавляют 5,00 *мл* бидистиллированной воды и 0,50 *мл* раствора нафтохинонсульфоновой кислоты (5). Точно через 10 мин. добавляют 1,0 *мл* ацетона. Экстинкцию измеряют при 546 *ммк* против пустого опыта.

Вычисление. Экстинкции калибровочных смесей наносят против концентрации сульфата (*мкмоли*). По этой калибровочной кривой вычисляют содержание сульфата в опытных смесях. Согласно обычным калибровочным кривым можно считать, что 0,590 *мкмолей* сульфата в опытной смеси в результате реакции окрашивания вызывают экстинкцию, равную 1,0. Поэтому вместо вычерчивания калибровочной кривой можно вычислить с достаточной точностью следующим образом:

$E \cdot 0{,}59 =$ *мкмолям* сульфата в опытной смеси для реакции окрашивания.

Для того чтобы получить *мкмоли* стероидного сульфата в 1 *мл* пробы, следует вычислять по формуле:

$(E_1 - E_2) \cdot 0{,}59 \cdot 10 \cdot 2 =$ *мкмолям* стероидного сульфата в 1 *мл* пробы,

где E_1 — экстинкция гидролизированной сульфатазой опытной смеси, E_2 — экстинкция негидролизированной сульфатазой опытной смеси, 10 — пересчет 0,1 *мл* пробы в смеси для ферментативной реакции на 1,0 *мл*, 2 — пересчет 2 *мл* (= аликвоте опытной смеси опыта для ферментативной реакции, примененной для реакции окрашивания) на 4 *мл* (= общему объему смеси опыта для ферментативной реакции).

Пример: анализировали 0,1 *мл* свежей вскипяченной мочи.

При измерении получены следующие значения:

Проба 1 (после ферментативного гидролиза): $E_1 = 0{,}600$
Проба 2 (без ферментативного гидролиза): $E_2 = 0{,}150$ } $E_1 - E_2 = 0{,}450$

$0{,}45 \cdot 0{,}59 \cdot 10 \cdot 2 =$ *мкмолям* стероидного сульфата в 1 *мл* мочи.

Источники ошибок. Сульфатаза ингибируется избытком неорганических солей, так же как и фосфатом и сульфатом андрогена (10^{-2} *М*).

Хлорид и фосфат в концентрациях $> 5 \cdot 10^{-1}$ *М* ингибируют реакцию окрашивания.

Фосфаты

Разница в свободном фосфате до и после воздействия фермента дает количество фосфата, связанного со стероидами, поскольку не имеется других легко расщепляемых фосфатазой сложных эфиров фосфорной кислоты.

Кислая фосфатаза практически свободна от загрязнений, мешающих определению.

Реактивы: 1) раствор молибдата аммония: 40,4 *мл* концентрированной серной кислоты вливают осторожно тонкой струей при помешивании в 109 *мл* бидистиллированной воды и охлаждают; 12,5 *г* тонко измельченного порошка $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ растворяют приблизительно в 100 *мл* бидистиллированной воды и вливают при помешивании в 125 *мл* разведенной H_2SO_4. После полного охлаждения доливают бидистиллированной водой до 250 *мл*; 2) восстанавливающий раствор метола: 25 *г* тонко измельченного порошка $K_2S_2O_5$ растворяют в 60 *мл* бидистиллированной воды; 0,2 *г* *п*-метиламинофенолсульфата растворяют в 10 *мл* бидистиллированной воды, смешивают оба раствора, доливают бидистиллированной водой до 100 *мл*, фильтруют через складчатый фильтр (первые 20 *мл* выбрасывают) и сохраняют в коричневой бутыли; 3) ацетат натрия (2,5 *М*): 85 *г* ацетата натрия $\cdot 3H_2O$ растворяют в бидистиллированной воде до 250 *мл*; 4) стандартный раствор стероидного фосфата (10^{-2} *М*): 48,4 *г* преднизолон-монофосфата (натриевая соль) растворяют в бидистиллированной воде, объем доводят до 10 *мл*; 5) стандартный раствор фосфата ($3{,}22 \cdot 10^{-3}$ *М*): 4,38 *г* KH_2PO_4 растворяют в бидистиллированной воде до 1000 *мл*. Перед употреблением 10 *мл* разбавляют бидистиллированной водой до 100 *мл*; 6) трис-ацетатный буферный раствор (1 *М* трис, pH 4,5): 2,42 *г* трис-оксиметиламинометана

растворяют в бидистиллированной воде до 1000 *мл*. К 10 *мл* этого раствора добавляют приблизительно 20 *мл* бидистиллированной воды, устанавливают pH посредством прибавления по каплям концентрированной уксусной кислоты равным 4,5 (стеклянный электрод), доливают бидистиллированной водой до 200 *мл*; 7) трихлоруксусная кислота (20% в/о): 20 *г* трихлоруксусной кислоты растворяют в бидистиллированной воде, объем раствора доводят до 100 *мл*; 8) фосфатаза [1] (600 *ед/мл*) [2]: 2 *мг* кислой фосфатазы растворяют в 0,2 *мл* ледяного буферного раствора трис-ацетата (6) и доливают бидистиллированной водой до 10 *мл*.

Все реактивы сохраняются при 4° по меньшей мере 3 недели. Рост бактерий и грибков делает растворы фермента непригодными.

Техника. *Постановка опыта*. В первую очередь испытывают правильность всего процесса анализа при помощи опытной смеси, которая содержит вместо пробы 0,1 *мл* стандартного раствора стероидного фосфата (4).

Ферментативная реакция. Отмеряют пипеткой в три пробирки: 1. 0,20 *мл* трис-ацетатного буферного раствора (6); 0,10 *мл* пробы; 0,50 *мл* раствора фосфатазы (8); бидистиллированной воды до 1,0 *мл*. 2. Все растворы за исключением раствора фосфатазы. 3. Только 0,5 *мл* раствора фосфатазы.

Хорошо перемешивают, инкубируют 4 часа в термостатированной водяной бане при 37°. Затем все пробирки ставят в ледяную баню, растворы 2 и 3 сливают вместе, получая таким образом «раствор 2» (в пробирке 3). В оба раствора (1 и 3 пробирки) добавляют 1,0 *мл* раствора трихлоруксусной кислоты (7). Если выпадает осадок белка или появится муть, их удаляют десятиминутным центрифугированием при 2000 *g*.

По 1 *мл* прозрачной надосадочной жидкости сливают в стаканы емкостью 10 *мл* с меткой, доливают до 5,0 *мл* бидистиллированной водой, затем начинают реакции окрашивания.

Реакция окрашивания. Измерение ведут при 578 *ммк*, толщина слоя 2 *см*. Измеряют против пустого опыта (состав: как калибровочная смесь, но без стандартного раствора фосфата).

Калибровочные смеси: в стаканы емкостью 10 *мл* с меткой последовательно отмеряют пипеткой: 0,10—1,0 *мл* стандартного раствора фосфата (5), 0,90 до 0,00 *мл* бидистиллированной воды, 0,50 *мл* раствора трихлоруксусной кислоты (7), бидистиллированной воды до 5,0 *мл*.

Растворы анализируют как надосадочные жидкости опытных основных смесей.

Основные опытные смеси. Надосадочную жидкость или калибровочную смесь соединяют с 1 *мл* раствора молибдата аммония (1) и 0,5 *мл* восстановительного раствора метола (2), хорошо смешивают и точно через 10 мин. добавляют 2 *мл* раствора ацетата натрия (3).

[1] КФ 3.1.3.2.

[2] Единицей считается количество фермента, которое освобождает за 1 час при 37° 1 *мкг* преднизолона из преднизолонмонофосфата.

Доливают бидистиллированной водой до 10 *мл* и основательно перемешивают. Точно через 10 мин. измеряют экстинкцию при 578 *ммк* против пустого опыта.

Вычисление. Экстинкцию калибровочных растворов наносят против микромолей фосфата в них. По этой калибровочной кривой вычисляют содержание фосфата в смесях основных опытов. Согласно этим калибровочным кривым 2,1 *мкмоля* фосфата в опытной смеси для реакции окрашивания вызывают экстинкцию 1,0. Поэтому, вместо того чтобы выводить калибровочную кривую, можно также вычислять с достаточной точностью следующим образом:

$$E\cdot 2{,}1 = \text{мкмолям фосфата в опытной смеси для реакции окрашивания.}$$

Для того чтобы получить *мкмоли* стероидного фосфата/*мл* пробы, вычисляют по следующей формуле:

$$(E_1 - E_2)\cdot 2{,}1\cdot 10\cdot 2 = \text{мкмолям стероидного фосфата/мл мочи пробы,}$$

где E_1 — экстинкция опытной смеси, гидролизированной фосфатазой; E_2 — экстинкция опытной смеси, не гидролизированной фосфатазой; 10 — перечисление 0,1 *мл* пробы в опытной смеси для ферментативной реакции на 1,0 *мл*; 2 — перечисление 1 *мл* (= аликвоте надосадочной жидкости, примененной для реакции окрашивания) на 2 *мл* (общий объем надосадочной жидкости).

Пример: анализируют 0,1 *мл* свежей вскипяченной мочи. При измерении получают следующие значения:

Проба 1 (после ферментативного гидролиза): $E_1 = 0{,}400$
Проба 2 (без ферментативного гидролиза): $E_2 = 0{,}100$ } $E_1 - E_2 = 0{,}3$.

Отсюда

$$0{,}3\cdot 2{,}1\cdot 10\cdot 2 = 12{,}5 \text{ мкмолей стероидного фосфата/мл мочи.}$$

Источники ошибок. Сульфат (10^{-2} *М*) и фосфат ($2\cdot 10^{-2}$ *М*) ингибируют ферментативную реакцию.

Определение стероидных алкоголей [1]

Большинство стероидов мочи являются гидрокси-стероидами, их можно определять также и со стероидными дегидрогеназами.

Принцип. 3α-оксистероидная дегидрогеназа [2] катализирует следующую реакцию:

$$3\alpha\text{-оксистероид} + \text{НАД} \rightleftharpoons 3\text{-кетостероид} + \text{НАД-Н} + \text{H}^+. \quad (1)$$

3β·17β — оксистероиддегидрогеназа [3] катализирует окисление

[1] B. Hurlock a. P. Talalay. Endocrinology, 1958, 62, 201.
[2] КФ 1.1.1.50.
[3] См. КФ 1.1.1.51.

нескольких стероидов:

$$3\beta\text{-оксистероид} + \text{НАД} \rightleftharpoons 3\text{-кетостероид} + \text{НАД-Н} + H^+; \quad (2)$$

$$17\beta\text{-оксистероид} + \text{НАД} \rightleftharpoons 17\text{-кетостероид} + \text{НАД-Н} + H^+; \quad (3)$$

$$16\beta\text{-оксистероид} + \text{НАД} \rightleftharpoons 17\text{-кетостероид} + \text{НАД-Н} + H^+ \quad (4)$$

Оксигруппа 17β-, как и 16β-, реагирует только, когда соседние атомы углерода не несут гидроксильных или кетоновых групп. Эстриол (3·16α·17β — OH), например, не окисляется.

16β-гидроксильная группа реагирует значительно медленнее, чем 3β- и 17β-гидроксильные группы.

Кетостероиды, образовавшиеся в результате указанных ферментных реакций, так же как и уже имеющиеся в моче, улавливают в виде гидразонов. Благодаря этому равновесие окисления количественно сдвигается в сторону кетостероидов. Величиной измерения служит увеличение абсорбции НАД-H_2 при 340 *ммк*. Если к опытной смеси сначала добавляют 3α-оксистероидную дегидрогеназу, а затем 3β·17β-оксистероидную дегидрогеназу, то можно определить в одной опытной смеси рядом соответственные оксистероиды. Следует придерживаться последовательности прибавления ферментов, так как 3β·17β-дегидрогеназа содержит еще от 1 до 2% 3α-дегидрогеназу. 3α-дегидрогеназа, напротив, не загрязнена 3β-17β-дегидрогеназой.

Оксистероиды встречаются в моче в очень незначительных концентрациях. Поэтому при их определении следует сперва сбогатить анализируемую смесь посредством экстракции мочи органическими растворителями. Другие составные части мочи не влияют на ферментативную реакцию. Добавленные к моче оксистероиды были вновь обнаружены в количестве 93% от введенного.

Р е а к т и в ы: 1) никотинамидадениндинуклеотид (около $6 \cdot 10^{-3}$ *М*β-НАД): 41 *мг* НАД растворяют в 10 *мл* бидистиллированной воды. Раствор сохраняют при 0° и замораживают после употребления; 2) буферный раствор глицина (1 *М*, pH 9,4): 7,5 *г* глицерина, 5,2 *г* гидразинсульфата и 0,2 *г* ЭДТА-$Na_2H_2 \cdot 2H_2O$ растворяют в 8,5 *мл* 1н. раствора NaOH, устанавливают pH посредством 1н. раствора NaOH равным 9,4 и доливают бидистиллированнсй водой до 100 *мл*; 3) буферный раствор фосфата (0,03 *М*, pH 7,2): а) 5,34 *г* $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ растворяют в бидистиллированной воде до 1000 *мл*; б) 4,08 *г* KH_2PO_4 растворяют в бидистиллированной воде до 1000 *мл*. Растворы *а* и *б* смешивают в сбъемных отношениях 72,6 : : 27,4 соответственно; 4) буферный раствор ацетата (1н., pH 4,5) : 43 *мл* 1 н. NaOH смешивают с 100 *мл* 1 н. раствора уксусной кислоты; 5) 3α-оксистероидная дегидрогеназа (около 100 *ед/мл* [1]) : препарат фермента растворяют в буферном растворе фосфата (3);

---

[1] 1 единица — это количество фермента, которое за 1 мин. превращает 1 *Моль* субстрата.

6) 3β·17β-оксистероидная дегидрогеназа (около 100 *ед/мл*): препарат фермента растворяют в буферном растворе фосфата (3); 7) β-глюкуронидаза (5000 *ед/мл*): КФ 3·2·1·31. Продажный препарат применяют неразведенным.

Буферные растворы сохраняются практически неограниченное время. Если в буферных растворах замечается помутнение или осадок (микроорганизмы), то их следует изготовить заново. Раствор НАД готовят еженедельно свежим или замораживают небольшими порциями. Разведенные растворы фермента во время анализа хранят при 0°, а затем замораживают. Таким образом они сохраняются несколько недель.

Техника. *Экстракция стероидов мочи*. Отмеряют пипеткой в центрифужную (полиэтиленовую) пробирку емкостью 60 *мл* с притертой пробкой 25 *мл* мочи и устанавливают рН посредством 2н. раствора H_2SO_4 равным 4,5. Затем добавляют 1,3 *мл* буферного раствора ацетата (4) и 5,0 *мл* раствора β-глюкуронидазы (7).

Инкубируют 24 часа при 30° в термостате или на водяной бане. Экстрагируют метиленхлоридом 3 раза по 15 *мл* каждый раз (по 30 встряхиваний каждый раз); если нужно, центрифугируют по 10 мин. при 4000 *g*, чтобы разделить фазы. Нижнюю фазу (метиленхлорид) отсасывают, смотря по обстоятельствам, шприцем Рекорд (емкостью 20 *мл*) с длинной иглой (для люмбальной пункции). Водный остаток доводят посредством 2н. H_2SO_4 до рН 1,0 и оставляют стоять 24 часа при комнатной температуре. Снова экстрагируют три раза, как описано выше, 15 *мл* метиленхлорида. Соединенные экстракты выпаривают досуха в ротационном выпарителе под уменьшенным давлением или посредством струи азота при температуре около 50°. Остаток растворяют в 5 *мл* метанола и пропускают в течение 10 мин. один-два раза через ионообменную колонку 0,7 *см* диаметром, 10 *см* длиной, амберлит МВ 1 (кислые эстрогены отделяются), колонку элюируют 25 *мл* метанола. Элюаты (около 30 *мл*), как описано, выпаривают досуха и растворяют в 15 *мл* водного метанола (70% о/о).

Раствор трижды экстрагируют 5 *мл* *н*-гексана[1] каждый раз (в делительных воронках или центрифужных пробирках); метаноло-водную фазу выпаривают досуха и растворяют в 0,5 *мл* метанола. Аликвоты этого раствора вносят в смесь опыта.

Постановка опыта. Измерение ведут при 340 *ммк*, толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 3 *мл*, температура измерения 25°. Измерение ведут против сравнительной кюветы с метанолом вместо экстракта мочи.

Последовательно отмеряют пипеткой в кюветы: 2,00 *мл* буферного раствора глицина (2), 0,10 *мл* раствора НАД (1), 0,01—0,10 *мл* экстракта мочи (метанол в сравнительную кювету), 0,09—0,10 *мл* метанола и дистиллированной воды до 2,96 *мл*.

---

[1] Отделяют липиды. Они могут делать водные опытные растворы мутными и мешать проведению опыта.

Перемешивают, измеряют экстинкцию E_1. Затем в кювету опыта и сравнительную кювету вносят по 0,02 *мл* раствора 3α-дегидрогеназы (5), перемешивают. Как только экстинкция достигнет постоянного значения, измеряют экстинкцию E_2. После этого снова вносят в кюветы по 0,02 *мл* раствора 3β·17β-дегидрогеназы (6), перемешивают, измеряют постоянное конечное значение экстинкции E_3.

Вычисление. Изменения экстинкции $E_2 - E_1 = \Delta E_\alpha$ и $E_3 - E_2 = \Delta E\beta$ входят в вычисление.

$\Delta E\alpha$ соответствует концентрации 3α-оксистероидов в кювете, $\Delta E\beta$ соответствует сумме 3β-, 17β-и 3β·17β-оксистероидов (в дальнейшем они для краткости называются 3β·17β-оксистероидами).

Таким образом:

$$\frac{\Delta E \cdot 3}{6{,}22} = \text{мкмолям 3α-оксистероидов/смесь опыта}$$

или *мкмолям* [1] 3β·17β-оксистероидов/смесь опыта.

3 — объем смеси опыта, *мл*; 6,22 — коэффициент экстинкции НАД-H_2 при 340 *ммк* (*см*^{2}/*мкмолей*).

Пример. Было экстрагировано 25 *мл* мочи и 0,1 *мл* из 0,5 *мл* экстракта, растворенного в метаноле, было внесено при помешивании в кювету. После добавления 3α-дегидрогеназы изменение экстинкции составило $\Delta E_\alpha = 0{,}300$.

Однодневное выделение больных составляло 1,5 *л* мочи, т. е. шестидесятикратное количество экстрагированного количества

$$\frac{0{,}300 \cdot 3}{6{,}22} \cdot 5 \cdot 60 = 43 \text{ мкмолей 3α-оксистероида в день.}$$

5 — пересчет с 0,1 *мл* аликвота на 0,5 *мл* объема экстракта; 60 — пересчет с 25 *мл* экстрагируемой мочи на 1,5 *л* однодневной мочи.

Нормальные значения [2]

Обследованные лица	Число определений	3α-оксистероиды		3β·17β-оксистероиды	
		мкмоли/24 часа	*мкмоли/л*	*мкмоли/24 часа*	*мкмоли/л*
Мужчины (от 20 до 47 лет)	13	43,7±13,0 (29,1 до 70,7)	41,8±14,1 (18,7 до 66,7)	7,52±2,71 (3,16 до 13,7)	6,90±2,75 (3,29 до 13,2)
Женщины (от 17 до 37 лет)	11	42,4±18,5 (16,4 до 74,2)	44,1±16,1 (26 до 78)	6,07±2,65 (2,61 до 11,6)	6,44±2,87 (2,90 до 14,6)

Числа представляют собой средние значения; в скобках — самые низкие и самые высокие аналитические значения.

---

[1] Строго говоря, дело здесь идет о *мкмолях* 3-оксистероидов + *мкмоли* 17β-оксистероидов + 1/2 *мкмоля* 3β·17β-оксистероидов.

[2] B. Hurlock a. P. Talalay. Endocrinology, 1958, 62, 201.

Другие методы определения

Ферментативное определение стероидов мочи может быть улучшено посредством хроматографического разделения стероидов. В этом случае становится возможным раздельное определение 3β- и 17β-оксистероидов. Был описан[1] способ разделения посредством бумажной хроматографии и следующего за ним ферментативного определения оксистероидов. Система растворителей при бумажной хроматографии выбирается в зависимости от анализируемых стероидов, в то время как ферментативно-оптический опыт подобен вышеописанному методу.

Приложение

Получение 3α-оксистероидной дегидрогеназы[2]. *Способ получения*. Фермент получают из Pseudomonas testosteroni. Посредством осаждения сульфатом аммония, осаждения протамином, а также осаждения ацетоном он обогащается до тех пор, пока число оборотов не возрастет приблизительно с 2500 до 5000 *молей* андростерона (мин. 10^5 *г* белка, 25°). От 3β · 17β-дегидрогеназы он особенно хорошо отделяется посредством осаждения сульфатом аммония. 3β · 17β-дегидрогеназа осаждается уже между 30—40% насыщения, в то время как 3α-дегидрогеназа осаждается только между 40—55% насыщения.

Чистота фермента. 3α-дегидрогеназа практически не содержит 3β · 17β-дегидрогеназы и алкогольной дегидрогеназы[3]. Однако она загрязнена Δ^5-3-кетостероидной изомеразой.

Субстратами фермента являются 3α-оксистероиды с 19, 21 и 24 атомами С (А/В-*цис* и А/В-*транс*). Стероиды C_{27} не превращаются.

Константа равновесия.

$$K_н = \frac{[\text{андростан-3}\cdot\text{17-дион}]\cdot[\text{НАД-Н}]\cdot[\text{H}^+]}{[\text{андростерон}]\cdot[\text{НАД}^+]} = 5{,}8\cdot10^{-9}\ \textit{моль/л}\ (25°,\ \text{pH 6 до 9,0})$$

при pH 9,1 и около 10-кратном избытке НАД андростерон практически количественно окисляется в андростандион. Поэтому можно и без добавления гидразина количественно определять 3α-оксистероиды этим способом.

Константа Михаэлиса для андростерона составляет $1{,}6\cdot10^{-6}$ *М* (25°, pH 9,1): K_M для НАД равняется $1{,}04\cdot10^{-4}$ *М* (pH 9,1, 10^{-5} *М* андростерона в качестве субстрата).

Определение активности. См. ниже (стр. 411); при 3β · 17β-дегидрогеназе вместо тестостерона применяется андростерон в качестве субстрата.

---

[1] P. Talalay. В кн. Colowick S. a. Kaplan N. Methods in Enzymology, Acad. Press. N. Y., 1962, v. V, p. 20.

[2] B. Hurlock a. P. Talalay. J. Biol. Chem., 1957, 227, 37.

[3] КФ 1.1.1.1 1.1. 1.2.

Фермент сохраняется годами в растворе при —20° и концентрации белка по меньшей мере 50 *мг/мл*.

Получение 3β·17β-оксистероидной дегидрогеназы [1]. *Способ получения*. 3β·17β-дегидрогеназа индуцируется в Pseudomonas testosteroni посредством добавления тестостерона. Клетки разрушаются ультразвуком, и фермент концентрируется посредством осаждения сульфатом аммония, протамином и ацетоном до возрастания числа оборотов с 2500 до 5000 *молей* тестостерона/ мин·10^5 *г* белка.

Препарат свободен от алкогольдегидрогеназы, однако содержит еще стероидную изомеразу, которая катализирует превращение Δ^5-андростен-3·17-диона в Δ^4-андростен-3,17-дион. Кроме того, он загрязнен около 1—2% 3α-дегидрогеназой.

Константа равновесия

$$K_н = \frac{[\Delta^4\text{-андростен-3,17-дион}]\cdot[\text{НАД-Н}]\cdot[H^+]}{[\text{тестостерон}]\cdot[\text{НАД}^+]} =$$

$$= 3{,}78\,(\pm 1{,}1)\cdot 10^{-8}\ моль/л\ (25°,\ pH\ от\ 6\ до\ 10).$$

При ферментативном способе работают при pH 9,0 и приблизительно при 10-кратном избытке НАД против тестостерона. При равновесии приблизительно в 378 раз больше андростендиона, чем тестостерона. Поэтому данный способ пригоден также для количественного определения тестостерона.

Константа сродства. Уже относительно малые концентрации тестостерона ($6\cdot10^{-6}$ *М*) ингибируют 3β·17β-оксистероидную дегидрогеназу. Наряду с комплексом Михаэлиса между субстратом и ферментом (ES) возникает при повышении концентрации тестостерона еще один комплекс, который состоит из двух молекул субстрата и одной молекулы фермента (ES_2). Константа сродства K_1 для ES (25° и тестостерон в качестве субстрата) = $0{,}93\cdot10^{-6}$ *М*; константа K_2 для ES_2 составляет $39{,}0\cdot10^{-6}$ *М*.

Ферментативная реакция сильно ингибируется естественными и синтетическими эстрогенами (например, диэтилстилбестролом).

Определение активности. В кювету (толщиной 1 *см*) отмеряют пипеткой 1 *мл* буферного раствора пирофосфата (0,1 *М*, pH 8,9) 0,5 *мкмолей* НАД и 15 *мкг* тестостерона. Доливают бидистиллированной водой до 3 *мл*; pH смеси 9,1. Реакцию начинают при 25° добавлением раствора фермента от 0,02 до 0,1 *мл*. Единицей считается количество фермента, которое вызывает изменение экстинкции на 0,001 в минуту при длине волны 340 *ммк* (спектрофотометр Бекмана). Фермент в растворе сохраняется годами при —20° и концентрации белка минимум 50 *мг/мл*.

---

[1] P. Talalay a. P. Marcus. J. Biol. Chem., 1956, 218, 675.

Определение 20-кетостероидов

Флуорометрический метод

Принцип. При гидрировании 20-кетостероидов восстановленным никотинамиддинуклеотидом (НАД-H_2) посредством 20 β-дегидрогеназы образуются стехиометрические количества НАД. Благодаря способности флуоресцировать в сильно щелочных растворах НАД можно определять флуорометрически. Если после полного ферментативного гидрирования 20-кетостероидов разрушить неиспользованный НАД-H_2, то после подщелачивания опытной смеси можно определить образовавшийся во время реакции НАД, а вместе с этим и соответствующие (см. выше) количества 20-кетостероидов.

Реактивы: 1) буферный раствор триса (0,15 *М*, рН 9,0): 2 *г* ЭДТА-$Na_2H_2 \cdot 2H_2O$ растворяют в 100 *мл* воды, доливают водой до 1000 *мл* и прибавляют 18 *мл* 10%-ного водного раствора триса; 2) буферный раствор триса (0,05 *М*, рН 7,3): 6,05 *г* трис-оксиметиламинометана и 1 *г* ЭДТА-$Na_2H_2 \cdot 2H_2O$ растворяют в 400 *мл* дистиллированной воды, при помощи стеклянного электрода устанавливают 10%-ным раствором HCl рН 7,3 ($\pm$ 0,05) и доливают дистиллированной водой до 1000 *мл*; 3) восстановленный никотинамидадениндинуклеотид ($2 \cdot 10^{-3}$ *М*, β-НАД-H_2): готовят раствор 5 *мг* НАД-H_2-Na_2 в 1 *мл* раствора 2 и разводят 3,5-кратным объемом дистиллированной воды; 4) стандартный раствор кортизола ($2 \cdot 10^{-4}$ *М*) [1]; 5) 20β-оксистероидная дегидрогеназа (10 *мг* белка на 1 *мл*) [1]; 6) никотинамидадениннуклеотид (около $1,5 \cdot 10^{-4}$ *М* и около $1,5 \cdot 10^{-5}$ *М* β-НАД: а) 5 *мг* НАД (α- и β-формы НАД отличаются пространственно по гликозидной связи между никотиновой кислотой и рибозой) растворяют в дистиллированной воде до 50 *мл*. Точное содержание НАД определяют по методике, указанной на стр. 117; б) раствор *а* разбавляют 10-кратным объемом дистиллированной воды; 7) флуоресцирующий стандарт (0,1 *мг* сульфата хинина на 1 *л*): 100 *мг* сульфата хинина растворяют в 0,1 н. растворе серной кислоты и по растворении объем доводят до 1000 *мл*. 1 *мл* этого раствора разбавляют 0,1н. раствором серной кислоты до 1000 *мл*.

Техника. Экстракцию 20-кетостероидов проводят, как указано на стр. 414.

Распределение против циклогексана. Экстракт, полученный при помощи метиленхлорида из 10 *мл* плазмы и выпаренный досуха, растворяют в 0,30 *мл* метиленхлорида, добавляют 1,50 *мл* циклогексана и 0,24 *мл* буферного раствора триса (1); встряхивают 30 мин., центрифугируют 15 мин. при 4000 *g*; верхнюю фазу выбрасывают, нижняя фаза содержит около 90% кортикостероидов плазмы.

Постановка опыта. Для ферментативной реакции применяют простые центрифужные пробирки емкостью 10 *мл*. Для определе-

[1] H. Hübener u. F. Sahrholz. Naturwissenschaften, 1959, 46, 112.

ния незначительной примеси НАД в препарате НАД-H_2 служит пустой опыт, для контроля ступеней опыта «Экстракция» и «Распределение против циклогексана» — контрольная смесь кортизола. Одновременно анализируют стандартные значения НАД с 0.15 до 8 *мкмолей*/ в опыте

Основной и контрольный опыт	Пустой опыт
с кортизолом	
0,08 *мл* пробы	0,08 *мл* дистиллированной воды
Стандартные растворы НАД	
0,01—0,05 *мл* стандартного раствора НАД (6а) или	
0,02 *мл* буферного раствора триса (2).	
Дистиллированной воды до 0,08 *мл*.	

Во все смеси отмеряют пипеткой 0,01 *мл* раствора НАД-H_2 (3). Кроме того, в пустой опыт и в стандартные растворы НАД вносят 0,01 *мл* 2,2 н. раствора HCl (8), а в основной и в контрольный опыт с кортизолом — 0,01 *мл* раствора 20 β-дегидрогеназы (5). Дают раствору постоять 30 мин. при комнатной температуре; по истечении этого времени реакция с участием дегидрогеназы заканчивается.

В основной опыт и в контрольный опыт затем отмеряют пипеткой кортизола по 0,01 *мл* 2,2н. раствора HCl; в пустой опыт и в стандартные растворы НАД по 0,01 *мл* раствора 20β-дегидрогеназы (5). Смеси хорошо перемешивают и во все пробирки отмеряют пипеткой по 0,30 *мл* 10н. раствора NaOH. Инкубируют в термостатированной бане 30 мин. при 38°, затем добавляют 3,00 *мл* бидистиллированной воды. Эти растворы применяют для измерения флуоресценции.

Флуорометрия. Измерительные приборы: спектральный фотометр с приспособлением для флуоресцентного анализа. Установка А. Линия возбуждающего излучения ртутной лампы 366 *ммк*. Измеряемое излучение: флуоресцентный свет (монохроматический над кварцевым монохроматором 460 *ммк*); ширина щели 0,2 *мл*; кюветы толщиной слоя 10 *мм*, температура измерения комнатная; объем анализируемой жидкости 3,41 *мл*. Все измерения ведут против кюветы со стандартным флюоресцирующим раствором (7). Считывание производят по шкале пропускаемости.

Калибровочная кривая (ср. стр. 465). Показания шкалы, измеренные для стандартных растворов НАД, наносят против *n молей* [1] НАД. Между 0,15 и 8 *n молей* НАД в анализируемом растворе интенсивность флуоресцентного света линейно пропорциональна количеству НАД. При содержании 1 *n моль* НАД в 3,41 *мл* раствора интенсивность составляет 40,5 деления шкалы.

Вычисление. Из интенсивности флуоресценции (в делениях шкалы) основного и контрольного опыта кортизола вычитается интен-

[1] 1*n моль* = 10^{-3} *мкмоль* = 10^{-9} *моль*.

сивность пустого опыта [1]. Количество НАД, соответствующее разнице, находят на калибровочной кривой. Посредством умножения этого значения на 3 получают содержание 20-кетостероидов в *п моль*/10 *мл* плазмы.

Пример. Контрольный раствор кортизола: 0,03 *мл* $2 \cdot 10^{-4}$ *М* стандартного раствора кортизола (= 6 *п моль* кортизола) разводят 10 *мл* бидистиллированной воды.

Измерение флуоресценции дало 72,0 деления шкалы, т. е. 1,78 *п моль* 20-кетостероидов/опытная смесь = 5,34 *п моль* 20-кетостероидов/проба = 89% от навески кортизола.

Плазма. 10 *мл* плазмы здорового человека; измерение флуоресценции дало: 49,5 деления шкалы, т. е. 1,22 *п моль* 20-кетостероидов/опытная смесь = 0,366 *п моль/мл* плазмы. После исправления на неполную экстракцию получено 0,41 *п моль* 20-кетостероидов/*мл* плазмы. Детали см. [2]

Примечание.

Метод был бы более чувствительным, если бы в распоряжении имелся НАД-H_2, свободный от α-НАД.

Приложение

Получение 20 β-оксистероидной дегидрогеназы [3]. Исходным материалом служит индуцированная посредством $\Delta^{4,17(20)}$-прегнандиен-11, 21-диол-3-она культура Streptomyces hydrogenans. Из культуры отцентрифуговывают мицелий (около 2000 *g*), который высушивается замораживанием.

390 *г* высушенного замораживанием мицелия или около 2 *кг* сырого мицелия суспендируют в 6 *л* буферного раствора триэтаноламина (0,05 *М*, pH 7,6; содержит 0,1% ЭДТА) и в движущемся состоянии подвергают действию ультразвуком [4] (30 *мл/мин*; 20 *кгц*; 70 *вт/см*^{2}; от 0 до 3°). Центрифугируют при 3000 *g* и 0°, надосадочную жидкость замораживают. Активность надосадочной жидкости составляет 2,6 *мкмолей/мин·мл*; объем: $4,8 \cdot 10^3$ *мл*.

На следующий день замороженную надосадочную жидкость подвергают оттаиванию под проточной водой и соединяют в мерном цилиндре емкостью 8 *л* в течение 1,5 часа с твердым сульфатом аммония до 50% насыщения. При этом помешивают и pH поддерживают равным 7,6 при помощи 10%-ного раствора NH_4OH. После того как весь сульфат аммония добавлен, перемешивают еще 30 мин., затем центрифугируют (около 5000 *g*) и декантируют надосадочную жидкость, так же как и рыхлый студенистый осадок. Твердый осадок растворяют приблизительно в 1000 *мл* раствора

---

[1] Пустой опыт при применении НАД-H_2 составляет 25—30 делений шкалы, независимо от того, используют ли плазму или воду.

[2] O. Lowry et al. J. Biol. Chem., 1957, **224**, 1047.

[3] H. Hübener u. F. Sahrholz. Bioch. Z., 1960, **333**, 88.

[4] Ультрадезинтегратор, тип ИД-750.

ЭДТА (0,1%), с pH 7,6, установленным посредством триэтаноламина, наполняют им целлофановые мешки и в продолжение ночи диализируют против 10 *л* раствора ЭДТА. На следующий — третий день наружную жидкость меняют еще 2 раза и каждый раз диализируют около 3 час., содержимое целлофановых мешков переносят в мерные цилиндры емкостью 4 *л*. Активность теперь 3,7 *мкмолей/мин·мл*: Объем: $1{,}6 \cdot 10^3$ *мл*. Мутный раствор соединяют при сильном помешивании с гелем фосфата. При этом значение pH поддерживают посредством 10%-ной уксусной кислоты равным 6 ± 0,1. Как только 80% активности фермента будут адсорбированы (испытывают на небольших пробах), центрифугируют при 3000 *g* и элюируют осадок геля двумя-тремя порциями по 500 *мл* фосфатного буферного раствора (0,05 *М*, pH 7,6)·20β-дегидрогеназу осаждают из объединенных элюатов посредством сульфата аммония (перекристаллизованного из 0,2%-ного раствора ЭДТА) — 55% насыщения. Осадок растворяют в 65 *мл* буферного раствора триса (0,025 *М*, pH 8,7) и в течение ночи диализируют против такого же буферного раствора. Активность диализированного препарата 46 *мкмолей/мин·мл*, объем 65 *мл*.

На 4-й день продиализированное содержимое мешка (около 70 *мл*) переносят на колонку с ДЕАЕ-целлюлозой (внутренний диаметр 6 *см*, высота наполнения 40 *см*) и хроматографируют 24 часа с буферным раствором триса (0,025 *М*, pH 8,7) — от 5 до 10 *мл* буферного раствора в 1 час). В последующие дни (с 5-го по 8-й) выполняется следующее. Буферный раствор, которым проявляли колонку, сменяют приблизительно 4 *л* 0,05 *М* буферного раствора триса (pH 8,7), в котором содержится 0,18 *М* NaCl, и проявляют 24 часа. Фермент элюируют 0,05 *М* буферным раствором триса (pH 8,7), в котором содержится 0,23 *М* NaCl, в течение приблизительно двух дней. 20β-дегидрогеназу осаждают из объединенных активных фракций (около 1,5 *л*) посредством сульфата аммония (60% насыщения). Осадок растворяют приблизительно в 25 *мл* раствора ЭДТА (0,1%; pH 8 устанавливается триэтаноламином) и центрифугируют до получения прозрачной надосадочной жидкости. Активность надосадочной жидкости 48,4 *мкмолей/мин·мл*; объем 25 *мл*.

20β-дегидрогеназу выкристаллизовывают в течение 3—10 дней посредством медленного добавления сульфата аммония (около 20% насыщения). Кристаллы отцентрифуговывают при 5000 *g*, осадок растворяют приблизительно в 20 *мл* раствора ЭДТА и еще два раза перекристаллизовывают. Детали см. сноску[3] на стр. 414.

Физико-химические данные. Константа Михаэлиса составляет для кортизона $5{,}1 \cdot 10^{-5}$ *М*; для вещества Рейхштейна $0{,}63 \cdot 10^{-5}$ *М*; для кортизола $13 \cdot 10^{-5}$ *М* и для кортикостерона — $24 \cdot 10^{-5}$ (при 25°, pH 7,3 и $1{,}7 \cdot 10^{-4}$ НАД-H_2). Для НАД-H_2 константа Михаэлиса равна $7{,}2 \cdot 10^{-5}$ *М* (при 25°, pH 7,3 и субстрата $2 \cdot 10^{-4}$ *М* кортизона). Число оборотов составляет 1800 *молей* кортизона/мин. 10^5 *г* белка (25°, pH 7,3). Оптимум pH реакции

находится при 6,4 (25°). Молекулярный вес фермента равен 92 300 (± 3 %) (вычислен из константы седиментации).

Фермент полностью инактивируется при температуре между 40 и 45°. При 0° и pH 8 он и в разбавленном растворе сохраняется неделями. В виде кристаллической взвеси фермент можно сохранять годами при 2—4° с потерей активности менее 10%.

Применение фермента для количественных измерений. Фермент можно применять для определения 20-кетостероидов. Обратная реакция, т. е. окисление 20β-оксистероида удается, если образовавшийся по уравнению (2) НАД-H_2 окисляют диафоразой [1] и дихлорфенолиндофенолом (ДХФ).

$$\text{HO—}\overset{|}{\underset{|}{\text{C}}}\text{—H} + \text{НАД} \rightleftharpoons \overset{|}{\underset{|}{\text{C}}}\text{=O} + \text{НАД-H} + \text{H}^+; \quad (2)$$

$$\text{НАД-H}_2 + \text{ДХФ} \rightarrow \text{НАД} + \text{восстановленный ДХФ}. \quad (3)$$

Так как дихлорфенолиндофенол, в противоположность своей восстановленной форме, абсорбирует свет при 600 *ммк*, то можно проследить за реакцией непосредственно фотометрическим способом (при анаэробных условиях). На биологическом материале метод еще не испытывался.

Фермент применяли также для определения прогестерона. После экстракции, предварительной очистки и хроматографического разделения на бумаге прогестерон ферментативно восстанавливается в Δ^4-прегнен-$20\beta_F$-ол-3-он; последний ацетилируют ^{14}С-ангидридом уксусной кислоты. Прегненолонацетат хроматографируют. После определения радиоактивности в ацетате можно вычислить первоначально имевшееся количество прогестерона. Этот метод наиболее чувствителен и наиболее специфичен по сравнению со всеми другими известными до настоящего времени методами. Детали см. сноску[3] на стр. 414.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Tamm J.* a. *Voigt K.* Acta Endocrinol., Suppl., 1960, **54**, 1.
2. *Bergmeyer H.* Methoden der enzymatischen Analyse. Weinheim, 1962, 5, 462.
3. *Асатиани В. С.* Новые методы биохимической фотометрии. М., изд-во «Наука», 1965, стр. 68.

[1] КФ 1.6.4.3.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

Определение перекиси [1]

Принцип. Перекись водорода разлагается пероксидазой [1], причем освобожденный кислород окисляет бесцветный донатор водорода ($ДН_2$) в окрашенное соединение *Д*:

$$H_2O_2 + ДН_2 \rightarrow 2H_2O + Д. \quad (1)$$

Донаторами водорода служат прежде всего ароматические амины (например, *о*-дианизидин, *м*-, или *п*-толидин), а также производные аминов, фенолы, хиноны и др. Если применять *о*-дианизидин, образуется красящее вещество красно-коричневого цвета, спектр абсорбции которого имеет «широкий» максимум около 460 *ммк*. Коэффициент экстинкции зависит от условий опыта; поэтому измеренную экстинкцию относят к экстинкции стандартного раствора H_2O_2. Практически измерение проводят при 436 *ммк* или смежной длине волны. Реакция заканчивается через 3 мин., окрашивание устойчиво в течение нескольких часов.

Реактивы (примерно на 20 определений): 1) смесь буферного раствора фермента (0,12 *М* фосфатный раствор, pH 7; 40 *мкг* пероксидазы/*мл*); 2,07 *г* $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ + 1,09 *г* $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ + + 6 *мг* пероксидазы растворяют в дистиллированной воде, объем доводят до 150 *мл*; 2) хромоген (5 *мг* *о*-дианизидингидрохлорид/*мл*); 10 *мг* *о*-дианизидингидрохлорида растворяют в 2 *мл* дистиллированной воды; 3) реактив на перекись водорода: при сильном помешивании к 50 *мл* раствора (1) добавляют 0,5 *мл* раствора (2); смесь сохраняют в темной склянке. Стойкость смеси можно повысить путем прибавления нескольких капель хлороформа; 4) перекись водорода — стандартный раствор (20 *мкг* H_2O_2/*мл*): а) 1,0 *мл* ~ ~ 35% раствора перекиси водорода разбавляют в мерной колбе емкостью 250 *мл* дистиллированной водой до метки. Определяют содержание H_2O_2; для этого 20 *мл* разбавляют добавлением 30 *мл* дистиллированной воды и 5 *мл* 1н. H_2SO_4, титруют 0,1н. $KMnO_4$ до сохраняющейся розовой окраски. 0,100 *мл* 0,1 н. раствора перманганата соответствует 1,70 *мг* перекиси водорода; б) соответственно результату титрования от 10 до 20 *мл* раствора *а* разбавляют дистиллированной водой до 1000 *мл*; 5) хлорная кислота

[1] КФ 1.11.1.7.

(около 0,6 *М*): 5,2 *мл* 70%-ной хлорной кислоты разбавляют дистиллированной водой до 100 *мл*.

Реактив для определения перекиси водорода (3) ежедневно приготовляют заново, причем раствор 1 берут не пипеткой, а сливанием. Если раствор (3) помутнеет, то его фильтруют. Стандартный раствор перекиси водорода быстро приготовляют перед употреблением путем разбавления устойчивого, примерно 35%-ного раствора.

Т е х н и к а. *Подготовка исследуемого материала*. Растворы перекиси водорода, перекиси натрия, перекиси магния, пербората натрия, перкарбоната, перекиси мочевины, перекиси стронция и т. д. разбавляют до содержания соответственно 5—50 *мкг* H_2O_2 в 1 *мл*. Мутные растворы, жиросодержащие вытяжки или экстракты из продуктов очищают фильтрацией; жир остается на бумажном фильтре. Если исследуемый материал окрашен белками, то его освобождают от белков хлорной кислотой.

Для этого в центрифужную пробирку емкостью 10 *мл* последовательно вносят 1 *мл* хлорной кислоты (5) и 1 *мл* пробы. Тонкой стеклянной палочкой хорошо перемешивают, центрифугируют 5—10 мин. приблизительно при 3000 *g*, прозрачную надосадочную жидкость сливают в пробирку и 0,2 *мл* используют для опыта.

Постановка опыта. Измерение ведут при 436 *ммк* (430—480 *ммк*); толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 5,2 *мл*; комнатная температура. Каждый раз ставят пустой опыт и опыт со стандартным раствором. Измерение ведут против пустого опыта. Реактив на перекиси (3) перед употреблением доводят до комнатной температуры.

В пробирку вносят пипетками последовательно: пустой опыт — 5,00 *мл* реактива перекиси (3) и 0,20 *мл* дистиллированной воды; опыт со стандартным раствором — 5,00 *мл* реактива перекиси (3) и 0,20 *мл* стандартного раствора перекиси (4); главный опыт — 5,00 *мл* реактива перекиси (3) и 0,20 *мл* раствора пробы.

Хорошо перемешивают, оставляют стоять в течение 5 мин. при комнатной температуре и измеряют экстинкции $E_{проба}$ и $E_{стандарт}$.

Вычисление. Сначала анализируют стандартные растворы и строят калибровочную кривую (ср., например, стр. 465), которая проходит линейно при содержании до 10 *мкг* перекиси (около 0,3 *мкмоля*). При экстинкции выше 0,600 (против пустого опыта) точность измерения на фотометре невелика. В этом случае пробу или безбелковую надосадочную жидкость разбавляют дистиллированной водой и анализируют заново. Для вычисления используют величину экстинкции стандартного раствора. Если последний содержит 4 *мкг* H_2O_2, то при анализе 0,2 *мл* пробы получают:

$$\frac{E_{проба}}{E_{стандарт}} \cdot 5 \cdot 4 = мкг\ H_2O_2/мл\ пробы.$$

При вычислении принимают во внимание предварительное разбавление.

Пример. Определение перекиси магния: 107,0 *мг* MgO_2 растворяют в 1000 *мл* 0,1н. серной кислоты, из них анализируют 0,2 *мл*.

Стандартный раствор H_2O_2 приготовляют следующим образом: на титрование раствора (4а) ушло 16 *мл* 0,1н. $KMnO_4$. Таким образом, раствор содержит $16 \cdot 1{,}7/20 = 1{,}36$ *мг* H_2O_2/*мл*$\cdot$14,7 *мл* разбавляют до 1000 *мл*. Раствор 4б содержал $14{,}7 \cdot 1{,}36 = 20$ *мг/л* или 20 *мкг* H_2O_2/*мл*. Были измерены следующие экстинкции: $E_{проба} = 0{,}147$; $E_{стандарт} = 0{,}224$.

$$\frac{E_{проба}}{E_{стандарт}} \cdot 5 \cdot 4 = 13{,}1 \text{ мкг } H_2O_2/\text{мл пробы},$$

или 21,7 *мкг* MgO_2/*мл* пробы, или 21,7 *мг* MgO_2/107 *мг*, или 20,2%.

Источники ошибок. Пероксидаза специфична для неорганических перекисей. Для органических перекисей результаты анализов не воспроизводимы. Поэтому они этим методом не определяются. Точность метода около 5%.

Определение нитрата [2]

Принцип. Нитратредуктаза [1] катализирует восстановление нитрата лейкометиленовым синим (MbH_2):

$$NO_3^- + MbH_2 \rightarrow NO_2^- + Mb + H_2O. \qquad (1)$$

Лейкометиленовый синий вновь восстанавливается формиатом, содержащемся в препарате нитратредуктазы-формиат-дегидрогеназы:

$$Mb + HCO_2^- + H_2O \rightarrow MbH_2 + CO_2 + OH^-. \qquad (2)$$

Образовавшийся по реакции (1) нитрит определяют колориметрически.

Реактивы: 1) фосфатный буферный раствор (0,2*M*, pH 7,2): 0,778 *г* NaH_2PO_4 и 5,162 *г* $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ растворяют в 100 *мл* дистиллированной воды; 2) уранилацетат (насыщенный): 10 *г* $UO_2(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ нагревают со 100 *мл* дистиллированной воды до 40°, охлаждают до комнатной температуры, надосадочную жидкость декантируют; 3) реактив Грисс—Илосвея: а) 10,5 *г* сульфаниловой кислоты, 6,8 *г* ацетата нитрия и 300 *мл* ледяной уксусной кислоты растворяют в 600 *мл* дистиллированной воды, 3 мин. кипятят, разбавляют дистиллированной водой до 1000 *мл*; б) 5,0 *г* α-нафтиламина добавляют к 1000 *мл* кипящей дистиллированной воды, затем вливают 5 *мл* концентрированной HCl; в) перед употреблением растворы *а* и *б* смешивают в 1 : 1 (объемов); 4) метиленовый синий + формиат ($5 \cdot 10^{-3}$ *M* Mb; 0,2 *M* формиата): 187 *мг* метиленового синего и 1,36 *г* формиата натрия растворяют в 100 *мл* фосфатного буфер-

---

1 КФ 1.6.6.1.

ного раствора (1); 5) нитратредуктаза (около 2 *ед/мл*): 20 *мг* препарата, полученного, как указано в приложении (см. стр. 421), суспендируют в 10 *мл* фосфатного буферного раствора (1). За единицу активности фермента принимают такое количество его, которое в условиях опыта образует в течение 20 мин. 1 *мкмоль* NO_2^- из 2 *мл* 0,01 *М* раствора KNO_3.

Взвесь фермента можно хранить в темноте при температуре 0—5° до двух недель. Все остальные растворы стойки при комнатной температуре.

Т е х н и к а. *Подготовка исследуемого материала.* Метод проверен при определении нитрата в моче человека, сыворотке, морской воде, дождевой воде, экстрактах листьев шпината и в питательной среде культуры некоторых водорослей.

Анализируемая проба должна содержать 0,01 до 0,1 *мкмоля* нитрата на 1 *мл* (приблизительную концентрацию определяют в предварительном опыте). Если проба содержит больше 0,1 *мкмоля* нитрата на 1 *мл*, то ее соответственно разбавляют дистиллированной водой.

Постановка опыта. Если наряду с нитратом проба содержит и нитрит, то в одной аликвоте определяют нитрит перед восстановлением нитрата, а в другой содержание общего нитрита после восстановления нитрата. Содержание нитрата получают из разницы между обоими результатами.

В пробирки Тунберга вносят пипетками:

Опытная смесь	Контрольная смесь
1,0 *мл* раствора фермента (5)	1,0 *мл* раствора фермента (5)
0,5 *мл* раствора метиленсинего — формиата (4)	0,5 *мл* раствора метиленсинего—формиата (4)
2,0 *мл* пробы	2,0 *мл* дистиллированной воды.

Из пробирок отсасывают воздух, оставляют стоять в течение 1,5—2 час. при 37° (водяная баня).

Определение нитрита. Измерение ведут при 525 *ммк*; толщина слоя 1 *см*, измерение ведут против контрольного раствора.

В центрифужные пробирки вносят пипеткой:

Опытная смесь	Контрольная смесь
2,0 *мл* раствора уранилацетата (2)	2,0 *мл* раствора уранилацетата (2)
3,0 *мл* из ферментной смеси	3,0 *мл* из ферментной смеси

В обе пробирки для обесцвечивания добавляют незначительное количество Al_2O_3 и центрифугируют. Отсчитывают экстинкцию прозрачной надосадочной жидкости (E_1). К 4,0 *мл* прозрачной надосадочной жидкости прибавляют 1,0 *мл* реактива Грисс—Илосвея (3в). Через 20 мин. отсчитывают экстинкцию E_2.

Вычисление. Концентрацию нитрата в *мкмолях* нитрата на 1 *мл* пробы, относящуюся к измеренной разности экстинкции $\Delta E = E_2 - E_1$, берут из калибровочной кривой.

Примеси. Ингибиторами нитратредуктазы являются цианид-, азид, *о*-фенантролин, α,α^1-дипиридил, тиомочевина и соли высокой концентрации (например, морская вода; здесь к смеси для ферментативной реакции прибавляют 1 *мл* дистиллированной воды; общий объем смеси 4,5 вместо 3,5 *мл*).

Метод специфичен для нитрата, так как нитратредуктаза, кроме нитратов, восстанавливает лишь хлораты, а реакция Грисс—Илосвея специфична для нитрита. Малоочищенные препараты нитратредуктазы могут содержать нитроредуктазу, которая катализирует восстановление ароматических нитросоединений. Эта примесь не мешает при анализе биологического материала.

Приложение

Получение препарата нитратредуктазы[1] E. coli, штамм Ямагуча, 7 час. при 30° анаэробно промывают в пептонной смеси, содержащей 0,1% KNO_3, 0,2% K_2HPO_4, 2% глюкозы, аминокислоты (гидролизат казеина) и экстракт из дрожжей. Центрифугируют; клетки промывают дистиллированной водой для удаления всего нитрита. Замороженные клетки 30 мин. растирают в холодной ступке с двойным весом порошка Al_2O_3. Полученную кашицу 10 мин. растирают с пятикратным количеством (по весу) холодного 0,1 *M* фосфатного буферного раствора (pH 7,1). В течение 20 мин. центрифугируют при 2000 *g*. Осадок отбрасывают. Надосадочную жидкость центрифугируют на холоду в течение 40 мин. при 20 000 *g*. Осадок содержит нитратредуктазу и формиатдегидрогеназу[2], его применяют как ферментный препарат.

Препарат сохраняют в виде суспензии в дистиллированной воде при 0—5°. Он устойчив около 2 недель.

Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

Определение магния [3]

Ферментный метод определения магния основан на способности ионов этого металла активировать изоцитратдегидрогеназу[3], которая катализирует реакцию

$$\text{изоцитрат} + \text{НАД} \rightarrow \text{НАД-Н} + H^+ + \alpha\text{-кетоглутарат} + CO_2.$$

Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

---

[1] Детали получения препарата см. F. Egami a. R. Sato. Proc. Japan. Acad., 1948, 24, 29.

[2] КФ 1.2.1.2; 1.2.2.1.

[3] КФ 1.1.1.41.

Определение пирофосфата [4]

Метод основан на применении «неорганической» пирофосфатазы, которая катализирует превращения пирофосфата в ортофосфат. Анализ заканчивают колориметрическим определением образовавшегося ортофосфата.

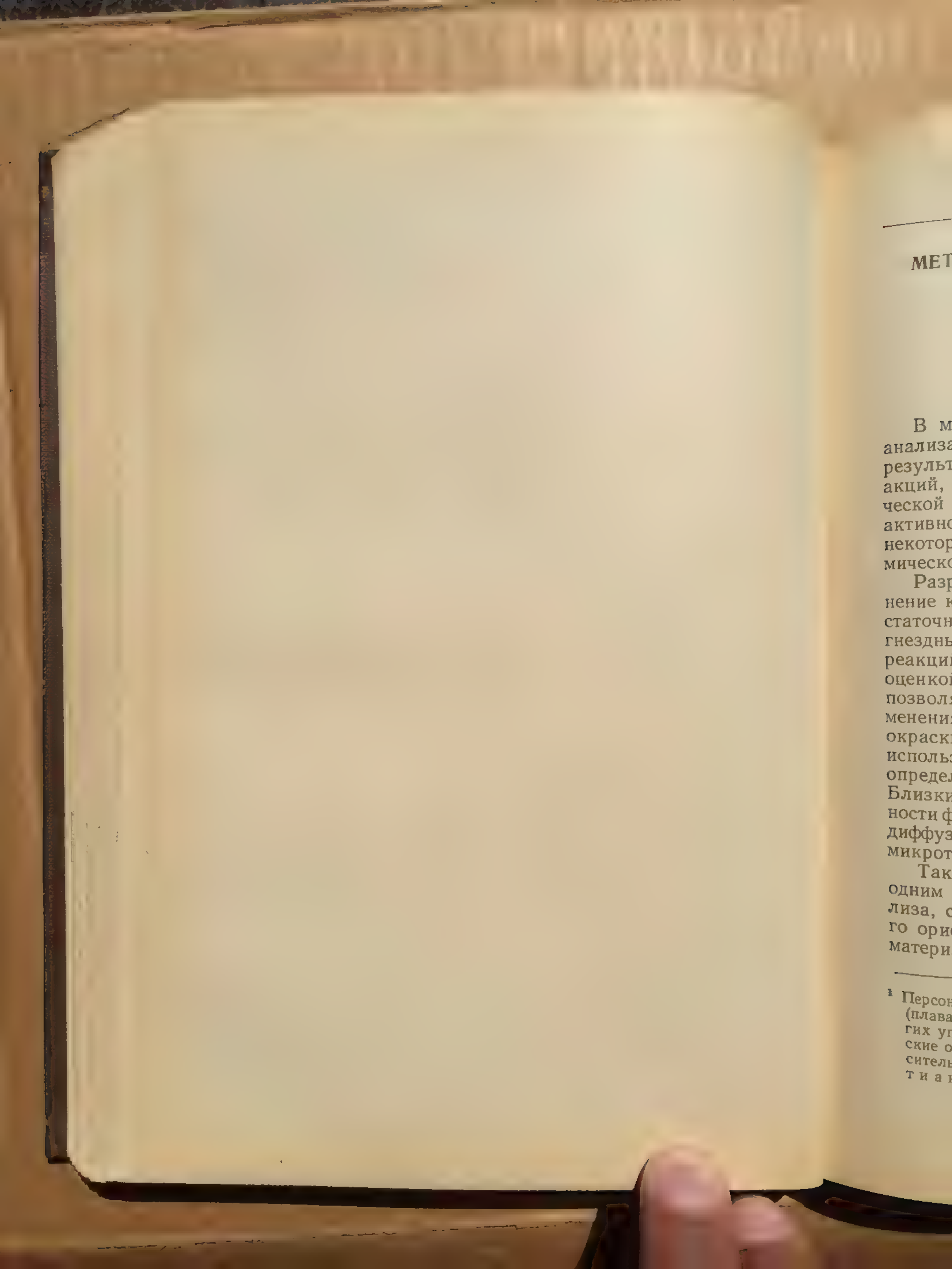
Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Bergmeyer H.* Methoden der enzymatischen Analyse. Weinheim, 1962, S. 633
2. *Egami F.* et al. Bull. chem. Soc. Japan, 1954, 27, 619.
3. *Baum P.* u. *Czok R.* Bioch. Z., 1959, **332**, 121; см. также [1], стр. 640.
4. *Bailey K.* см. [1], стр. 544.

ЧАСТЬ III

Определение активности ферментов



МЕТОДЫ АНАЛИЗА, ОСНОВАННЫЕ НА ПРИМЕНЕНИИ МИКРОСИСТЕМЫ А. А. ПОКРОВСКОГО[1]

В микросистеме разработаны технические приемы капельного анализа, пригодные для ориентировочной количественной оценки результатов ряда биохимических и, в частности, ферментных реакций, и предложены достаточно точные, пригодные для клинической практики экспресс-микрометоды определения ферментной активности. Осуществление этой задачи потребовало разработки некоторых оригинальных приборов и технических приемов биохимического микроанализа.

Разработанная техника микроанализа предусматривает применение как при наиболее простых, ориентировочных, так и при достаточно точных аналитических приемах одних и тех же многогнездных пластмассовых реакторов. При проведении капельных реакций с визуальной колориметрической или нефелометрической оценкой эти реакторы служат одновременно компараторами, позволяющими осуществлять сравнительную оценку скорости изменения цветовых оттенков, а равным образом и интенсивности окраски (или мутности) исследуемых растворов. Эти же растворы используются в целях термостатирования реакционных смесей при определении ферментной активности в изотермических условиях. Близкие по форме реакторы применены при определениях активности ферментов, требующих на конечной стадии проведения микродиффузии газообразных продуктов реакции и последующего микротитрования.

Таким образом, многогнездные пластмассовые реакторы служат одним из основных элементов предлагаемой техники микроанализа, создающим преемственность между этапами предварительного ориентировочного и последующего более точного исследования материала.

---

[1] Персональное сообщение А. А. Покровского, 1967. Описание микросистем (плавающего компаратора, термостата, кюветы, вкладышей, приставок и других упоминаемых ниже в тексте) см. А. А. Покровский в кн. «Химические основы процессов жизнедеятельности». М., Медгиз, 1962, стр. 311. Относительно приготовления буферных и нормальных растворов см. В. С. Асатиани. Методы биохимических исследований. М., Медгиз, 1956.

Определение активности карбоангидразы (КФ 4.2.1.1) [1]

Принцип основан на измерении времени, необходимого для сдвига pH с 9,0 до 6,3 в результате растворения CO_2

$$HOH + CO_2 = H_2CO_3 = H^+ + HCO_3^-.$$

Реактивы: 1) индикаторно-буферный раствор: а) трис-буфер ($2{,}8 \cdot 10^{-2}$ *М*; pH 9,0): 340 *мг* триоксиметиламинометана растворяют в 100 *мл* дистиллированной воды. pH доводят до 9,0 добавлением по каплям разведенной HCl; б) 5 *мг* фенолового красного растворяют в 100 *мл* трис-буфера pH 9,0. Полученный раствор имеет ярко-малиновый цвет. Хранить в холодильнике. При хранении стоек; 2) индикаторно-буферный раствор для приготовления второго колориметрического стандарта: в 100 *мл* фосфатного буфера pH 6,3 (смешивают 50 *мл* 0,1 *М* раствора KH_2PO_4 с 10 *мл* 0,1н. NaOH и объем смеси доводят дистиллированной водой до 100 *мл*) растворяют 5 *мг* фенолового красного (цвет ярко-желтый). При хранении в холодильнике стоек; 3) вода, насыщенная CO_2: вода, насыщенная углекислотой, готовится путем пропускания через барботер (стеклянный фильтр № 4) тока углекислого газа в сосуд с дистиллированной водой, охлажденной до 0°. Для получения CO_2 используется сухой лед, помещенный в камеру прибора. Указанная система позволяет поддерживать температуру насыщенной CO_2 воды в пределах 0—1° в течение необходимого времени при условии пополнения израсходованного льда. Расход сухого льда на 100 определений не превышает 50—60 *г*.

Техника. Перед началом опыта плавающий компаратор[1], используемые растворы, опытные пробы и пипетки охлаждаются в ледяном термостате до 0—1°. Температура в гнездах компаратора контролируется миниатюрным термометром. Эти условия поддерживаются в течение всего времени определения.

В 3 гнезда плавающего компаратора вносят по 0,02 *мл* исследуемой жидкости. В первые 2 гнезда (1-й колориметрический стандарт и опытная проба) помещают по 0,04 *мл* индикаторно-буферного раствора 1 (цвет малиновый), а в третье гнездо (2-й колориметрический стандарт, по которому регистрируется время окончания реакции) — 0,04 *мл* раствора 2 (цвет желтый). Затем в гнезда I и III добавляют по 0,06 *мл* дистиллированной воды. Содержимое всех гнезд перемешивают. Затем в гнездо с исследуемой жидкостью быстро вносят, перемешивая микромешалкой, 0,06 *мл* насыщенной CO_2 воды и замечают время начала реакции. Концом реакции считают время, за которое происходит уравнивание окраски опытной пробы со 2-м колориметрическим стандартом.

Контрольная проба ставится аналогично, но раствор фермента заменяют охлажденной до 0° дистиллированной водой. Время

---

[1] Описание прибора и детали анализа см. сноску на стр. 425.

контрольной реакции (спонтанная реакция гидратации CO_2) при этих условиях соответствует 100—110 сек.

Расчет активности. Отношение скорости ферментной реакции к скорости спонтанной реакции принято для выражения активности фермента в условных единицах:

$$A = \frac{t_0 - t}{t - 1},$$

где t_0 — время спонтанной реакции; t — время реакции с ферментом (1 сек. соответствует продолжительности смешивания растворов). За единицу активности карбоангидразы принимают ускорение катализируемой реакции в два раза по сравнению с некатализируемой при стандартных условиях (t — 0—1; t_0 = 100—110 сек.; разведение крови 1:1000). При работе с кровью полезно проводить расчет удельной активности фермента (на 1 млн. эритроцитов) по формуле:

$$A \text{ на 1 млн. эритроцитов} = \frac{A \cdot 1 \text{ млн.}}{\text{число эритроцитов}}.$$

Нормальные величины активности карбоангидразы в крови человека составляют 2,01 ± 0,08 ед. и в расчете на 1 млн. эритроцитов — 0,458 ± 0,006 ед.

Определение активности глутаматдегидрогеназы (КФ 1.4.1.2)

Принцип основан на измерении скорости реакции восстановительного аминирования α-кетоглутаровой кислоты в присутствии исследуемого образца. Количество израсходованного НАД-H_2 измеряется спектрофотометрически при 340 *ммк*.

$$\underset{\text{α-кетоглутаровая кислота}}{HOOC{-}CH_2{-}CH_2{-}C({=}O){-}COOH} + NH_4^+ + \text{НАД-}H_2 \xrightarrow[\text{гидрогеназа}]{\text{глутаматде-}} \underset{\text{глутаминовая кислота}}{HOOC{-}CH_2{-}CH_2{-}CH(NH_2){-}COOH} + \text{НАД} + H_2O$$

Реактивы: 1) фосфатный буфер 1/15 *M*; pH 7,8, содержащий 5 *ммолей* ЭДТА; 2) 80 *мМ* раствор α-кетоглутарата натрия; 3) 8 *мМ* раствор НАД-H_2. 6,8 *мг* динатриевой соли β-НАД-H_2 (фирмы «Serva», Австрия) растворяют в 1,0 *мл* фосфатного буфера; 4) 500 *мМ* раствор NH_4Cl. Все реактивы готовят на фосфатном буфере $^1/_{15}$ *M* pH 7,8.

Техника. Полуавтоматическими или капельными микропипетками в микропробирку вносят: 100 *мкл* фосфатного буфера, содержащего 5 *мкмолей* ЭДТА (1), 20 *мкл* раствора НАД-H_2 (3), 20 *мкл* раствора NH_4Cl (4) и 40 *мкл* раствора исследуемого материала. Смесь инкубируют при 22° в течение 5 мин., забирают микропипеткой в микрокювету и измеряют при 340 *ммк* (E_{340}) скорость реакции в течение 3 мин. Содержимое микрокюветы выдувают в микропробирку с предварительно внесенными в нее 20 *мкл* раствора α-кетоглутарата (2). После тщательного перемешивания отмечают на секундомере время начала реакции. Инкубационная смесь забирается в микрокювету, которая устанавливается в кюветодержатель микроприставки[1] к СФ-4А. Уменьшение оптической плотности при 340 *ммк* (E_{340}) замеряется через каждые 30 сек. в течение 3 мин.

Активность фермента выражается ΔE_{340} в 1 мин. на 1,0 *г* ткани. Порядок расчета такой же, как и в случае сукцинатдегидрогеназы (см. стр. 429).

Определение активности сукцинатдегидрогеназы (КФ — 1.3.99.1 [3])

Принцип основан на измерении падения оптической плотности при 600 *ммк* (E_{600}) 2,6-дихлорфенолиндофенола, восстанавливающегося при окислении сукцината:

COONa–CH₂–CH₂–COONa + O=C₆H₂Cl₂=N–C₆H₄–OH —(+HOH, сукцинатдегидрогеназа)→

сукцинат натрия; 2,6-дихлорфенолиндофенол

COONa–CH=CH–COONa + HO–C₆H₂Cl₂–NH–C₆H₄–OH

фумарат натрия; 2,6-дихлорфенолиндофенол (лейкоформа)

Реактивы: 1) фосфатный буфер $^1/_{15}$ *M*; pH 7,4; 2) 0,5 *M* раствор сукцината натрия; 3) 1,5 *мМ* раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола; 4) 5,0 *мМ* раствор цианистого натрия. Все реактивы готовятся на фосфатном буфере $^1/_{15}$ *M* (pH 7,4).

Техника. Полуавтоматическими или капельными микропипетками в микропробирку вносят 60 *мкл* фосфатного буфера (1), 40 *мкл* раствора цианистого натрия (4), 40 *мкл* раствора 2,6-ди-

[1] Микроприставка изготовляется и применяется в Институте питания АМН СССР.

хлорфенолиндофенола (3) и 40 *мкл* исследуемого материала. Смесь тщательно перемешивают и инкубируют в водяной бане при 22° в течение 3 мин. Содержимое микропробирки забирают в микрокювету спектрофотометра и замеряют изменение экстинкции в ходе реакции. Затем смесь выдувают в микропробирку, в которую предварительно вносят 40 *мкл* раствора сукцината натрия (2). Инкубационная смесь перемешивается повторным выпусканием и насасыванием в кювету (3—4 раза) и на секундомере отмечается время начала реакции. Кювета устанавливается в кюветодержатель микроприставки к СФ-4А и измеряется оптическая плотность при 600 *ммк* (E_{600}) через каждые 30 сек. в течение 3 мин. Температура в камере спектрофотометра постоянно контролируется помещенным в нее термометром.

Принцип расчета. $A = \Delta E/мин \cdot B$, где A — активность фермента, B — разведение исследуемого материала, $\Delta E = \Delta E_0 - \Delta E_k$ — разность изменения экстинкций опытного и контрольного растворов. Таким образом, $\Delta E/мин$ — средняя скорость изменения экстинкции за счет ферментной реакции. $\Delta E/мин$ отражает угол наклона кривой, характеризующей кинетику ферментного восстановления 2,6-дихлорфенолиндофенола.

Активность сукцинатдегидрогеназы целесообразно выражать в мкмолях субстрата, окисленного за 1 мин. ферментом, содержащимся в грамме ткани. Поскольку количество восстановленного красителя пропорционально количеству окисленного сукцината, то по стандартной кривой, отражающей экстинкцию 2,6-дихлорфенолиндофенола, или по коэффициенту молярной экстинкции легко рассчитать количество превращенного субстрата в микромолях.

Определение активности цитохромоксидазы (КФ 1.9.3.1) [4]

Принцип метода основан на спектрофотометрической оценке интенсивности окисления восстановленного цитохрома ферментом, содержащимся в исследуемом растворе.

$$4\ \text{ферроцитохрома}\ c + O_2 + 4H^+ \xrightarrow{\text{цитохромоксидаза}} 4\ \text{феррицитохрома}\ c + 2H_2O$$

Реактивы: 1) фосфатный буфер $^1/_{15}$ *М*; рН 7,4; 2) раствор цитохрома *с*: 8,0 *мг* цитохрома *с* (фирмы «Реанал») растворяют в 1,0 *мл* фосфатного буфера; 3) 3,2%-ный раствор гидросульфита в фосфатном буфере (готовить непосредственно перед употреблением).

Техника. Предварительно проводят восстановление цитохрома *с*. С этой целью к 1 *мл* раствора цитохрома *с* добавляют 20 *мкл* раствора свежеприготовленного гидросульфата (3). Обычно при этом оптическая плотность при 550 *ммк* (E_{550}) раствора цитохрома *с* возрастает более чем в два раза. 180 *мкл* приготовленного таким образом раствора полуавтоматической или капельной

микропипеткой вносят в микропробирку, откуда раствор забирают в микрокювету. Последнюю помещают в кассету оптической приставки спектрофотометра СФ-4А и измеряют скорость реакции окисления цитохрома. Затем для изучения скорости ферментной реакции содержимое микрокюветы смешивают в микропробирке с 40 *мкл* исследуемого материала. После тщательного перемешивания смеси повторным выпусканием и насасыванием ее в микрокювету (3—4 раза) отмечают по секундомеру время начала реакции. Затем кювета с реакционной смесью вновь устанавливается в кюветодержатель микроприставки и оптическая плотность (E_{550}) замеряется через каждые 30 сек. в течение 3 мин.

Активность фермента выражается ΔE_{550} в 1 мин. на 1,0 *г* ткани. Порядок расчета такой же, как и в случае с сукцинатдегидрогеназой.

Определение активности кислой рибонуклеазы (КФ 2.7.7.16) [5]

Принцип основан на спектрофотометрическом определении продуктов ферментного гидролиза РНК, неосаждаемых раствором уранилацетата в $HClO_4$.

$$\text{Высокополимерная РНК} \xrightarrow[\text{РНК-аза}]{+n\ \text{HOH}} (n+1) \text{ фрагментов РНК}.$$

Реактивы: 1) 0,1 *М* ацетатный буфер (рН 5,0); 2) 0,3%-ный раствор РНК в ацетатном буфере. Продажная РНК, как правило, должна быть подвергнута дополнительной очистке при помощи диализа в ацетатном буфере по Кунитцу.

Очистка РНК по Кунитцу. 4 *г* РНК суспендируют в 16 *мл* бидистиллированной воды и взвесь охлаждают до —2°. После этого на холоду осторожно по каплям добавляют 3,5 н. NaOH вплоть до полного растворения РНК. При этом при помощи индикаторной бумажки постоянно контролируют рН раствора, следя за тем, чтобы он не превышал 6,0. После полного растворения РНК раствор ее диализируют на холоду против 0,1 *М* ацетатного буфера рН 5,0 (1) в течение двух суток. Обычно для этой цели используют около 2 *л* буферного раствора.

После окончания диализа очищенный раствор РНК переносят в 5 объемов ледяной уксусной кислоты и оставляют на 10 мин. при комнатной температуре. Осадок РНК отделяют на фильтре и промывают последовательно 4 *мл* воды, этанолом и эфиром вплоть до полного высушивания; 3) 0,25%-ный раствор уранилацетата в 0,5 н. $HClO_4$.

Техника. В три микропробирки плавающего реактора вносят по 120 *мкл* раствора РНК и по 20 *мкл* исследуемого материала. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и инкубируют при 37° в течение 30 мин. Одновременно проводят контрольные исследования качества забуференного раствора субстрата и оптической плотности исследуемого материала.

Контроль за качеством забуференного раствора субстрата: в две микропробирки помещают по 120 *мкл* раствора РНК и по 20 *мкл* ацетатного буфера (ставится один контроль на серию определений).

Контроль на оптическую плотность исследуемого раствора: в две микропробирки помещают по 120 *мкл* буферного раствора и 20 *мкл* исследуемого материала (контроль ставится на каждый опытный ряд).

Опытные и контрольные пробы инкубируют вместе в течение 30 мин. Затем добавляют по 160 *мкл* раствора уранилацетата (3). Выдерживают в течение 60 мин. при 4°. Пробы центрифугируют при 4000 *об/мин* в течение 10 мин. Оптическую плотность надосадочной жидкости при 260 *ммк* (E_{260}) замеряют в микрокювете спектрофотометра СФ-4А. Активность выражают в ΔE_{260} на 1 *г* ткани в 1 мин. Расчет проводят по формуле:

$$A = \frac{\Delta E_{260} \cdot B}{T},$$

где ΔE_{260} — экстинкция опытной пробы за вычетом экстинкций контрольных проб, T — время инкубации в минутах, B — разведение исследуемого материала.

Определение активности кислой дезоксирибонуклеазы (КФ 3.1.4.5) [6]

Принцип основан на спектрофотометрическом определении количества неосаждаемых $HClO_4$ продуктов ферментного гидролиза ДНК.

$$\text{Высокополимерная ДНК} \xrightarrow[\text{ДНК-аза}]{+n\ \text{HOH}} (n+1)\ \text{фрагментов ДНК.}$$

Реактивы: 1) 0,1 *М* ацетатный буфер (рН 5,0); 2) 0,1%-ный раствор ДНК в ацетатном буфере; 3) 0,5 н. раствор $HClO_4$; 4) 0,05%-ный раствор сывороточного альбумина.

Техника. В три микропробирки полуавтоматическими или капельными микропипетками вносят по 120 *мкл* раствора ДНК (2) и 20 *мкл* исследуемого раствора.

Одновременно проводят контрольные исследования качества забуференного раствора субстрата и оптической плотности исследуемого материала.

Контроль за качеством раствора субстрата: в две микропробирки помещают по 120 *мкл* раствора ДНК и по 20 *мкл* раствора альбумина (4) (один контроль на серию определений).

Контроль оптической плотности исследуемого раствора: в две микропробирки помещают по 120 *мкл* ацетатного буфера (1) и 20 *мкл* исследуемого раствора (контроль ставится на каждый опытный ряд). Опытные и контрольные пробы инкубируют вместе при 37° в течение 30 мин. После окончания инкубации добавляют по 160

мкл 0,5 н. раствора $HClO_4$, выдерживают в течение 15 мин. при 4°. Пробы центрифугируют при 4000 *об/мин* в течение 10 мин. Оптическую плотность надосадочой жидкости при 260 *ммк* (E_{260}) замеряют в микрокювете спектрофотометра СФ-4А. Активность выражают как ΔE_{260} на 1 *г* ткани в 1 мин. Порядок расчета такой же, как и при кислой РНК-азе.

Определение активности катепсина [КФ 3.4.4.9) [7]

Принцип основан на спектрофотометрическом определении количества кислоторастворимых продуктов ферментного гидролиза гемоглобина.

$$\text{Глобин} \xrightarrow[\text{катепсин}]{+n\,HOH} (n+1)\ \text{фрагментов глобина.}$$

Реактивы: 1) 0,1 *М* ацетатный буфер (pH 5,0); 2) 6%-ный раствор гемоглобина в ацетатном буфере; 3) 8%-ная трихлоруксусная кислота.

Техника. В три опытные микропробирки плавающего реактора полуавтоматическими или капельными микропипетками вносят по 40 *мкл* раствора гемоглобина (2) и 80 *мкл* исследуемого материала. Реакционную смесь инкубируют при 37° в течение 30 мин. Реакцию останавливают добавлением 160 *мкл* раствора трихлоруксусной кислоты (3). Одновременно ставят контрольные пробы для определения оптической плотности субстрата и исследуемого материала. С этой целью по 80 *мкл* исследуемого раствора вносят в каждую из двух контрольных микропробирок и помещают в холодильник (0°) на 30 мин. По истечении этого времени в них добавляют по 160 *мкл* трихлоруксусной кислоты (3) и 40 *мкл* раствора гемоглобина (2).

Затем опытные и контрольные пробы выдерживают при 4° в течение 30 мин. и центрифугируют при 4000 *об/мин* в течение 10 мин. Оптическую плотность надосадочной жидкости при 280 *ммк* (E_{280}) замеряют в микрокювете спектрофотометра СФ-4А. Активность выражают как ΔE_{280} на 1 *г* ткани в 1 мин. Порядок расчета такой же, как и в случае с кислой РНК-азой (см. стр. 430).

Определение активности бутирилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.8) [8]

Принцип основан на измерении скорости уменьшения интенсивности окраски железосодержащих комплексов гидроксамовых кислот, образующихся при взаимодействии гидроксиламина с эфирами (реакция Хестрина). Скорость падения оптической плотности в этом случае отражает интенсивнось ферментного расщепления эфиров холина.

Хромогенная реакция:

$$(CH_3)_3N{-}CH_2{-}CH_2{-}O{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}{-}CH_2{-}CH_2{-}CH_3 + NH_2OH \rightarrow$$

бутирилхолин

$$\rightarrow CH_3{-}CH_2{-}CH_2{-}CO{-}NHOH + (CH_3)_3N{-}CH_2{-}CH_2OH$$

гидроксамовая кислота

$$CH_3{-}CH_2{-}CH_2{-}CONHOH + Fe^{+++} \rightarrow CH_3{-}CH_2{-}CH_2{-}C\begin{matrix}\nearrow O\ldots Fe^{++} \\ \searrow NH{-}O \end{matrix}$$

гидроксамовая кислота — окрашенный железосодержащий комплекс гидроксамовой кислоты

Ферментная реакция

$$(CH_3)_3N{-}CH_2{-}CH_2{-}O{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}{-}CH_2{-}CH_2{-}CH_3 \xrightarrow[\text{бутирилхолинэстераза}]{+HOH} (CH_3)_3N{-}CH_2{-}CH_2OH +$$

бутирилхолин — холин

$$+ CH_3CH_2CH_2COOH$$

масляная кислота

Реактивы: 1) веронал-мединаловый буфер, pH 7,4; 2) 25*мМ* раствор бутирилхолинхлорида. Готовится непосредственно перед употреблением на буферном растворе. Можно хранить в замороженном виде не более 2 суток; 3) 1н. HCl; 4) 4н. HCl; 5) 3,5н. NaOH; 6) 0,1 *М* HCl; 7) 13,9%-ный раствор гидроксиламина: 27,8 *г* солянокислого гидроксиламина растворяют в дистиллированной воде, объем доводят до 200 *мл*. Перед опытом к 1 объему этого раствора приливают 2 объема 3,5н. NaOH; 8) 10%-ный раствор хлорного железа в 0,1 *М* HCl.

Техника. В три микропробирки полуавтоматическими или капельными микропипетками вносят по 80 *мкл* веронал-мединалового буфера (1), 40 *мкл* исследуемого материала и 20 *мкл* раствора бутирилхолина (2). Инкубируют при 37° в течение 30 мин. Одновременно проводят контрольные определения оптической плотности субстрата и оптической плотности исследуемого раствора.

Контроль оптической плотности субстрата (один на серию опытов): в микропробирке смешивают 120 *мкл* буферного раствора (1) и 20 *мкл* раствора бутирилхолина (2).

Контроль оптической плотности исследуемого материала (на каждый опытный ряд): в микропробирки помещают по 100 *мкл* буферного раствора (1) и 40 *мкл* исследуемого материала.

Обе контрольные пробы инкубируют вместе с опытными. После окончания инкубации во все пробирки добавляют по 20 *мкл* 1н. HCl (3), 40 *мкл* раствора гидроксиламина (7), 20 *мкл* раствора 4н. HCl (4), 20 *мкл* 10%-ного $FeCl_3$ (8), 160 *мкл* дистиллированной

воды. После добавления каждого реактива содержимое пробирок тщательно перемешивают. Образовавшийся осадок отделяют центрифугированием при 2000 *об мин* в течение 10 мин., и прозрачную, окрашенную в красноватый цвет жидкость колориметрируют при помощи микронасадки при 510 *ммк* на ФЭК-Н-57 (фильтр № 5). Окраска стабильна в течение 30 мин.

Активность фермента выражают в *мкмолях* субстрата, расщепляемого 1 *г* ткани в 1 мин.

Определение активности ацетилэстеразы (КФ 3.1.1.6) [9]

П р и н ц и п основан на колориметрическом определении *п*-нитрофенола, освобождающегося при ферментативном гидролизе *п*-нитрофенилацетата:

$$O_2N\text{—}C_6H_4\text{—}O\text{—}\underset{\underset{O}{\|}}{C}\text{—}CH_3 \xrightarrow[\text{ацетилэстераза}]{+HOH} O_2N\text{—}C_6H_4\text{—}OH + CH_3COOH$$

п-нитрофенилацетат; *п*-нитрофенол; уксусная кислота

Р е а к т и в ы: 1) фосфатный буфер 1/15 *М*, pH 7,0; 2) 0,17 *М* раствор субстрата: 32 *мг* *п*-нитрофенилацетата растворяют в 1,0 *мл* метилового спирта. Раствор хранится в морозильной камере холодильника при —15° не более 4 дней; 3) субстратно-буферный раствор. Готовится непосредственно перед опытом следующим образом: 0,1 *мл* основного субстратного раствора набирают пипеткой и, опустив кончик ее ниже уровня жидкости, при постоянном встряхивании приливают к 5,0 *мл* фосфатного буфера.

Т е х н и к а. В три микропробирки полуавтоматическими или капельными микропипетками вносят по 40 *мкл* исследуемого раствора и 80 *мкл* субстратно-буферной смеси (3). Пробы инкубируют при 37° в течение 30 мин.

Одновременно проводят контрольные исследования качества раствора субстрата и оптической плотности исследуемого материала.

Контроль качества раствора субстрата: в две микропробирки помещают по 80 *мкл* субстратно-буферного раствора (3) и 40 *мкл* буферного раствора (1) — ставится один на серию определений.

Контроль оптической плотности исследуемого материала: в две микропробирки вносят по 40 *мкл* исследуемого раствора и 80 *мкл* буферного раствора (1) — ставится на каждый опытный ряд.

Контрольные пробы инкубируют вместе с опытными. После окончания инкубации опытные и контрольные пробы помещают в ледяную ванну и прибавляют по 40 *мкл* охлажденного буферного раствора. Колориметрируют при 413 *ммк* на ФЭК-Н-57 (фильтр № 2).

Количество освободившегося *n*-нитрофенола определяют по стандартной кривой, построенной по *n*-нитрофенолу в фосфатном буфере. Активность фермента рассчитывают по формуле:

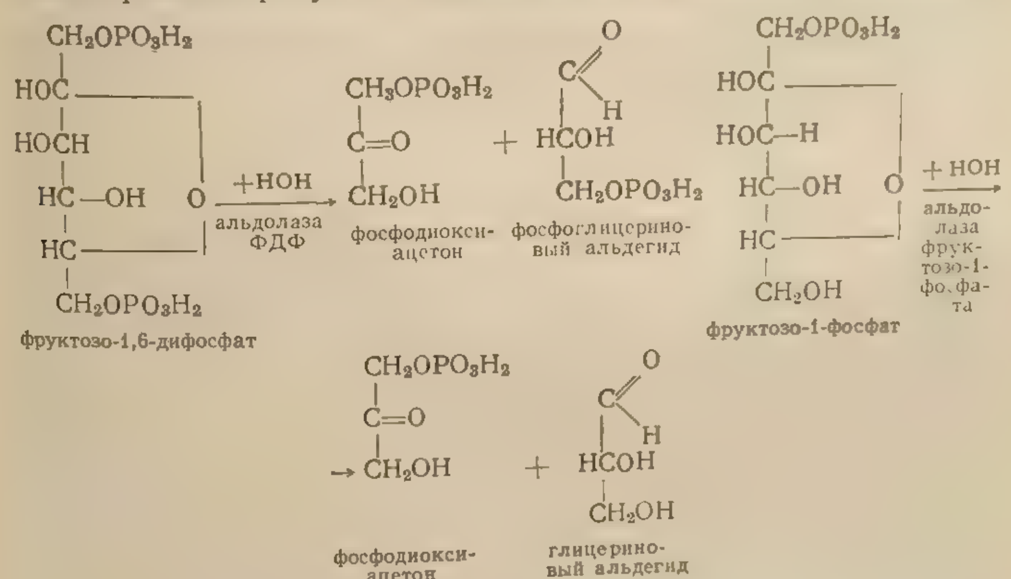
$$A = \frac{a \cdot B}{T},$$

где *A* — активность фермента в мкмолях на 1 *г* в минуту, *a* — количество микромолей освободившегося *n*-нитрофенола, *B* — разведение исследуемого раствора, *T* — время инкубации, мин.

Определение активности альдолаз с использованием в качестве субстратов фруктозо-1,6-дифосфата и фруктозо-1-монофосфата [10]

(кетозо-1-фосфат-альдолаза; КФ 4.1.2.7)

П р и н ц и п основан на связывании фосфотриоз, образующихся после ферментативного гидролиза субстратов, гидразином, с последующим определением триоз, освобождающихся при щелочном гидролизе продуктов динитрофенилгидразиновой реакции.



Р е а к т и в ы: 1) 0,4н. раствор HCl; 2) 0,75н. раствор NaOH; 3) веронал-мединаловый буфер pH 7,4; 4) растворы субстратов в 0,0056 *M* растворе гидразина (pH 7,4): 10 *мг* бариевой соли субстратов растворяют в 1,8 *мл* бидистиллированной воды, прибавляют 8,2 *мг* гидразин-гидрохлорида и доводят pH до 7,4, добавляя 0,75н. NaOH. Доводят до конечного объема 4,0 *мл* веронал-мединаловым буфером pH 7,4; 5) 0,1%-ный раствор 2,4-динитрофенилгидразина (ДНФГ) в 2н. HCl : 50 *мг* ДНФГ растворяют в 8,0 *мл* концентрированной HCl (12н.) при слабом нагревании и доводят до 50 *мл* водой; 6) 5 *мМ* раствор диоксиацетона.

Техника. В три опытные микропробирки полуавтоматическими или капельными микропипетками вносят по 40 *мкл* исследуемого раствора и 20 *мкл* субстратного раствора (4). В две контрольные микропробирки помещают по 40 *мкл* исследуемого раствора. Пробы инкубируют при 37° в течение 30 мин. После окончания инкубации во все пробирки добавляют по 20 *мкл* 0,4н. HCl и затем в контрольные пробы по 20 *мкл* субстрата. Остальные реактивы приливают во все пробирки одновременно. Для дефосфорилирования образовавшихся фосфотриоз прибавляют 40 *мкл* 0,75н. NaOH (2) и оставляют при комнатной температуре на 30 мин. Затем добавляют по 20 *мкл* раствора ДНФГ (5) и снова оставляют на 30 мин. Через 5 мин. после добавления 120 *мкл* 0,75н. NaOH (2) пробы колориметрируют на ФЭК-Н-57 при 540 *мм* (фильтр № 5). Окраска неустойчива и колориметрию следует заканчивать не позднее чем через 15 мин. после появления окраски. Количество образовавшихся триоз определяют по стандартной кривой, построенной по диоксиацетону. Активность фермента рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{a \cdot B}{2T},$$

где A — активность фермента в *мкмоль/г/мин*, a — количество образовавшихся фосфотриоз, B — разведение исходного материала, T — продолжительность реакции (мин.).

Электрофорез белков и изоэнзимов в крахмальном геле [11]

Метод основан на использовании высоких концентраций специально гидролизованного крахмала, образующего мелкопористый гель. Наличие в геле мелких ячеек (пор), заполненных буфером, обусловливает возможность «молекулярной фильтрации», значительно повышающей разрешающую силу фракционирования. В качестве других преимуществ зонального электрофореза в крахмальном геле можно указать на незначительную сорбцию белка крахмалом, небольшую величину электроосмоса, легкость протекания в геле диффузии и т. д. [12, 13, 14, 15]. Недостатками метода Смитиса, влияющими на получение четких и хорошо воспроизводимых результатов, являются трудности нивелировки слоя геля и соблюдения изотермических условий во время опыта. Описываемая модификация метода, в значительной степени устраняющая эти недостатки, заключается в использовании для приготовления слоя носителя и проведения электрофореза прямоугольной пластмассовой кюветы, плавающей в ванне аппарата ЭФА-1, применяемого для электрофореза на бумаге. Преимуществом модификации является возможность легковоспроизводимого получения пластинки геля (блока) с одной и той же толщиной слоя и со строго горизонтальной поверхностью, поскольку плавающая на поверхности жидкости сбалансированная кювета всегда точно нивелирована по горизонтальному уровню. Использование плавающей кюветы упроща-

ет и охлаждение геля, которое осуществляется путем помещения кюветы в воду с тающим льдом, а также способствует снижению реофоретического эффекта, так как дополнительная жидкость в ванне создает условия влажной камеры. С целью уменьшения электроосмоса конструктивно предусмотрена возможность помещения кюветы с гелем выше уровня электролита в соединительных и электродных кюветах.

Р е а к т и в ы: 1) смесь ацетон-HCl для гидролиза крахмала; 2) 1,0 *M* раствор ацетата натрия; 3) *трис*-цитратный буфер, pH 8,6 (трис — 0,076 *M*; лимонная кислота — 0,005 *M*); 4) боратно-щелочный буфер, pH 8,6 (борная кислота — 0,3 *M*; NaOH — 0,06 *M*); 5) насыщенный раствор амидо-черного 10 *B*. Готовится смесь из 100 *мл* ледяной уксусной кислоты, 500 *мл* метанола и 500 *мл* дистиллированной воды, добавляется 0,2 *г* амидо-черного; 6) промывающая смесь для удаления не связавшейся с белками краски. Готовится смесь ледяной уксусной кислоты, метанола и дистиллированной воды в соотношении 1:5:5 (по объему); 7), 0, 1н. NaOH + ЭДТА (500 *мг* на 1 *л* раствора); 8) растворы для определения белка ультрамикроэкспресс-методом: а) 2%-ный раствор углекислого натра в 0,1н. растворе NaOH; б) 0,5%-ный раствор пятиводной сернокислой меди в 1%-ном растворе виннокислого натра; в) непосредственно перед определением готовится реактив *в* путем смешивания реактивов *а* и *б* в соотношении 50:1; г) реактив Фолина. Перед опытом реактив Фолина разводится дистиллированной водой в 2 раза.

О б о р у д о в а н и е: 1) блок питания и камера аппарата ЭФА-1; 2) плавающая кювета; 3) хроматографическая бумага (быстро впитывающая) Ленинградской бумажной фабрики им. Володарского; 4) воронка Бюхнера (№ 5) и колба с отводом для промывания крахмала; 5) термостат для сушки крахмала; 6) колба Вюрца для приготовления крахмального геля и его деаэрации; 7) водоструйный насос; 8) центрифуга на 4000 оборотов; 9) ФЭК-Н-57 с оптическими приставками и микрокюветами; 10) микроавтоматические пипетки или тарированные капельницы; 11) плавающий компаратор с водным термостатом.

Плавающая кювета выполнена из органического стекла и состоит из двух частей: несущей кюветы и прямоугольной трехслойной рамки, крепящейся штырьками к пластинке. Трехслойная съемная рамка, в которую заливается крахмал, используется после окончания электрофореза для разрезания геля на различном уровне в зависимости от цели опыта. Для проведения электрофореза лучше использовать платиновые или хлорсеребряные электроды и лишь в крайнем случае можно применять угольные электроды.

Подготовка и проведение опыта. Гидролиз крахмала проводится в смеси солянокислого ацетона (1 объем концентрированной HCl на 100 объемов ацетона) в течение двух с половиной часов при температуре 38,5° (на 100 *г* крахмала берется 200 *мл* смеси). Такой режим гидролиза обеспечивает хорошие механические и электро-

форетические свойства геля. После окончания инкубации гидролиз останавливают добавлением 1,0 *М* уксуснокислого натра (на 100 *г* крахмала берется 50 *мл* раствора уксуснокислого натра). Условия гидролиза и продолжительность его определяются сортом картофельного крахмала и в каждом конкретном случае подбираются экспериментально (см. [15]).

Блок геля готовится путем заливки нагретой до 80—95° смеси гидролизованного крахмала с буфером непосредственно в кювету, плавающую в ледяной ванне. При этом крахмал равномерно распределяется во внутренней рамке, образуя одинаковый по толщине слой носителя, который во избежание высыхания закрывается полиэтиленовой пленкой. Для приготовления пластинки геля высотой 6 *мм* обычно используется 22,4 *г* гидролизованного крахмала в 160 *мл* буфера. Наиболее четкое разделение белковых компонентов сыворотки удается получить при использовании «прерванной буферной системы»: в кювете — крахмальный гель на трис-цитратном буфере с pH 8,6 (трис — 0,076 *М*; лимонная кислота — 0,005 *М*); в соединительных и электродных кюветах — боратно-щелочной буфер с pH 8,6 (борная кислота — 0,3 *М*; NaOH — 0,06 *М*).

После гелификации, продолжающейся не менее 1,5—2 *час.*, удаляется полиэтиленовая пленка и на расстоянии 4—5 *см* от катодного конца блока лезвием тонкой бритвы делаются стартовые щели (длина 10—30 *мм*, глубина — 5 *мм*).

Исследуемая жидкость наносится на полоски быстро впитывающей хроматографической бумаги, соответствующие размерам щелей (обычно при длине стартовой щели 10 *мм* фракционированию подвергается 20 *мкг* сыворотки крови). В случае необходимости увеличения количества фракционируемого материала в стартовую щель вставляются две и более полосок бумаги.

После нанесения проб щель снова покрывается полиэтиленовой пленкой. Электрофорез проводится в зависимости от целей опыта в течение 5—6 час. при напряжении 10—15 *в* на 1 *см* длины геля. После окончания электрофореза разрезанные тонкой леской (диаметр 0,15 *мм*) верхнюю и нижнюю половинки блока геля окрашивают (в течение 30 мин.) насыщенным раствором амидо-черного 10 Б в смеси метанола, ледяной уксусной кислоты и дистиллированной воды (в соотношении 5:1:5). Не связавшийся с белками краситель отмывается той же смесью. Для ускорения обесцвечивания можно вводить в красящую смесь 10% глицерина.

Методом зонального электрофореза в плавающей кювете в сыворотке крови человека достаточно отчетливо можно выделить 15 фракций белка: преальбумин (быстрые α_1-глобулины), альбумин, три постальбуминовые фракции (медленные α_1-глобулины), $F\alpha_2$-фракцию, несущую церулоплазмин, протромбин (быстрые α_2-глобулины); β_c-фракцию, являющуюся трансферином. Различают несколько типов трансферина, наиболее часто встречается трансферин типа С. α,β-область представлена 4 полосками гаптогло-

бина, резко сдвинутыми к аноду. Это характеризует вторую белковую группу сыворотки крови (в первой группе α,β-фракции отсутствуют, в третьей группе они налицо, но в меньшей степени сдвинуты к аноду, чем во второй). Различные типы трансферинов и гаптоглобинов определяются наследственностью, но не коррелируют как между собой, так и с группами крови. За α,β-областью следует $S\alpha_2$-фракция, относящаяся к медленным α_2-глобулинам; в непосредственной близости от старта видна одна β-липопротеидная фракция (βl_p); за стартовой линией находятся 2 катодные фракции — γ_1- и γ_2-глобулинов. При исследовании сыворотки крови крысы выделено 13 белковых фракций, а в гемолимфе гусеницы обнаружено 8 белковых зон. В целях количественного определения белковых фракций могут быть использованы два приема: элюция красителя из окрашенных электрофореграмм и экстракция белка из неокрашенных полосок геля с последующим установлением его количества микрометодом.

Определение белковых фракций по элюции краски

Поскольку в поверхностном слое распределение белка идет неравномерно, опыты проводятся с нижней половиной блока геля высотой 4,5 *мм*. Электрофореграмма геля разрезается поперек на участки, строго соответствующие по размеру окрашенным фракциям. Каждый кусочек высушивается фильтровальной бумагой и взвешивается. В целях определения поправки на «фон» для контрольных проб берутся участки электрофореграммы, не содержащие белка (впереди преальбуминовой фракции). Для экстракции к альбуминовому участку добавляется 50 *мл*, к γ-глобулиновым — по 20 *мл* и к остальным фракциям — по 10 *мл* экстрагирующего раствора. В качестве элюата используется 0,1н. NaOH с добавлением ЭДТА (500 *мг* на 1 *л*). Введение комплексона в элюирующую смесь обусловлено нестабильностью краски вследствие наличия в растворе следовых количеств тяжелых металлов. Оптическая плотность элюата определяется при светофильтре № 7 (максимум поглощения при 610 *ммк*) на ФЭК-Н-57, снабженном оптической приставкой и микрокюветами. Данные контрольных проб вычитаются из показателей опытных проб. Для определения процентного соотношения между отдельными фракциями белков оптическая плотность всех элюатов суммируется и принимается за 100%, а затем вычисляется, какой процент по отношению к ней приходится на каждую фракцию. Для перевода этих показателей в грамм-проценты определяется общий белок, количественное содержание которого в 100 *мл* сыворотки крови принимается за 100%, и по отношению к нему вычисляется грамм-процент каждой фракции белка. Следует отметить, что, как и другие методы оценки содержания белковых фракций по элюции красителя, описанный метод не свободен от неточностей, связанных с различиями в сорбции отдельных белковых фракций гелем, особенно в непосредственной близости от старта

(«адсорбционная дорожка»), неодинаковым коэффициентом удержания краски различными белковыми зонами, зависимостью между интенсивностью окраски и дозой исследуемого материала, временем окрашивания, способом и продолжительностью обесцвечивания и т. д. Особенно значительные искажения возможны при анализе сыворотки с гемолизом (даже не определяемым визуально) вследствие появления фракции свободного гемоглобина и резкого усиления окраски гаптоглобинов. Вместе с тем при тщательной стандартизации условий электрофореза и обработки электрофореграмм можно достигнуть вполне удовлетворительной воспроизводимости результатов.

Определение белковых фракций после элюции белка

Неокрашенная электрофореграмма разрезается на поперечные полоски (шириной по 1 *мм*). Каждый кусочек переносится в пробирку, в которую добавляется 0,4 *мл* физиологического раствора; после этого гель подвергается гомогенизации и центрифугированию при 4000 *об/мин* в течение 20 мин. Элюат отсасывается и в нем проводится определение белка ультрамикроэкспресс-методом [16]. Учитывая, что в таких небольших по размеру полосках геля содержание белка невелико, рекомендуемые указанными авторами соотношения между реагентами следует изменить. В частности, объем исследуемого раствора необходимо увеличить в 5 раз (с 0,04 до 0,2 *мл*), количество реактива Фолина — в 2 раза (с 0,02 до 0,04 *мл*), объем реактива № 3 (50 частей 2%-ного раствора углекислого натрия в 0,1н. растворе NaOH и 1 часть 0,5%-ного раствора пятиводной сернокислой меди в 1%-ном растворе виннокислого натра) остается без изменений (0,1 *мл*).

Метод может быть применен и для определения изоферментов (неспецифическая эстераза, кислая и щелочная фосфатаза и др.). Электрофоретическое разделение изоферментов требует разработки специальных условий, наиболее адекватных для проявления активности того или иного фермента (подбор соответствующих буферных систем, pH, ионной силы и т. д.).

В качестве примера ниже приводится электрофоретическое разделение изоферментов неспецифической эстеразы. Лучшее фракционирование этого фермента наблюдается в геле, приготовленном на трис-HCl-буфере (pH 8,4). В электродных и соединительных кюветах используется боратно-щелочной буфер с pH 8,6 (борная кислота — 0,3 *М*, NaOH — 0,06 *М*). Электрофорез проводится при градиенте напряжения 20 *в* на 1 *см* длины геля. При таких условиях продолжительность электрофореза составляет всего 1—2 часа.

Для определения неспецифической эстеразы используется метод азосочетания Нахласа и Зелигмана [17] в модификации Гомори [18].

Предлагаемая [11] ниже модификация указанной методики применительно к определению фракционированной в геле эстеразы

заключается в значительном уменьшении в инкубационной среде субстрата, сокращении времени предварительной инкубации, уменьшении дозы краски и применении постинкубации в условиях влажной камеры.

Техника. Для приготовления инкубационного раствора берут 25 *мл* фосфатного буфера (0,2 *М*, pH 7,1), к которому по каплям при постоянном перемешивании добавляют 0,4 *мл* 2%-ного раствора α-нафтилацетата в 50%-ном водном растворе ацетона. Температуру раствора доводят до 37° и затем в него добавляют диазониевую соль *о*-дианизидина в количестве 25 *мг*. После добавления краски инкубационный раствор должен быть сразу же профильтрован и использован. Полоски геля предварительно инкубируют в течение 2—3 мин. в 50 *мл* подогретого до 37° фосфатного буфера (0,2 *М*, pH 7,1) и лишь затем добавляют инкубационную смесь в количестве 25 *мл* (общий объем инкубационной среды 75 *мл*). Инкубацию продолжают 1 час при 37°. Появление полос ярко-красного цвета свидетельствует об эстеразной активности. Поскольку удлинение инкубации обычно приводит к окраске фона продуктами реакции, то после удаления инкубационной среды дополнительно выдерживали гель при 37° в условиях влажной камеры в течение 15 мин. Это повышает интенсивность окраски фракций эстеразы.

Проведение опытов в описанных условиях, наиболее оптимальных, с точки зрения авторов для неспецифической эстеразы, позволяет выявить 7 изоферментных фракций с эстеразной активностью в сыворотке крови крысы и 4 фракции — в сыворотке человека. У человека наибольшая активность фермента локализована в области $S\alpha_2$-фракции, у крысы — в зоне альбумина.

Описанная модификация метода электрофореза в геле крахмала, обладающая достаточно высокой разрешающей способностью, очень удобна и вполне доступна при обычной электрофоретической аппаратуре, применяемой для электрофореза на бумаге. Ее можно с успехом использовать для изучения белковых фракций и ферментов не только в сыворотке, но и в спинномозговой жидкости, моче и т. д. В последнем случае необходимым условием успешного фракционирования является концентрирование исходного материала (посредством диализа, при помощи сефадекса и т. д.), пока содержание белка в нем будет превышать 1—2%.

Электрофорез сывороточных белков и ферментов в крахмальном блоке [19]

Принцип. Разделение компонентов белковой смеси осуществляется вследствие различной величины заряда поверхностных частиц белка, которые в электрическом поле перемещаются к противоположному полюсу с различными скоростями. В основу метода положено использование в качестве носителя картофельного крахмала, позволяющего получить стабильные обособленные электрофоретические зоны.

Описываемая модификация предусматривает возможность проведения электрофореза в тонком слое носителя при уменьшенном эндоосмотическом перемещении электролита и рассчитана на использование для количественной оценки белковых фракций ультрамикроэкспресс-методом. Электрофорез в тонком слое носителя позволяет применять для фракционирования относительно небольшие дозы белка и дает возможность проводить во время опыта более эффективное и равномерное охлаждение блока, что предупреждает денатурацию белковых веществ и искажение фронта движущихся фракций. Снижение эндоосмотического тока в процессе опыта, достигаемое помещением лотка с носителем выше уровня электролита в соединительных и электродных кюветах, улучшает распределение белковых молекул по величине заряда и повышает разрешающую силу фракционирования.

Реактивы: 1) буферный раствор (мединал — HCl), ионная сила (μ) 0,05, pH 8,6; 2) насыщенный раствор амидо-черного 10В. Готовится смесь из 100 *мл* ледяной уксусной кислоты и 900 *мл* метилового спирта, прибавляется 0,2 *г* амидо-черного; 3) раствор для отмывания не связавшейся с белками краски: 20 *мл* ледяной уксусной кислоты разбавляются дистиллированной водой до 300 *мл*; 4) реактивы для определения белка ультрамикроэкспресс-методом: а) 2%-ный раствор углекислого натрия в 0,1 н. растворе едкого натра; б) 0,5%-ный раствор $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ в 1%-ном растворе виннокислого натра; в) непосредственно перед определением готовится реактив в путем смешивания реактивов а и б в соотношении 50 : 1; г) реактив Фолина. Перед опытом реактив Фолина разводится дистиллированной водой в 2 раза.

Оборудование: 1) блок питания аппарата ЭФА-1 и установка для проведения электрофореза в крахмальном блоке; 2) хроматографическая бумага (быстро впитывающая) Ленинградской бумажной фабрики им. Володарского; 3) сушильный шкаф; 4) термометр на 150°; 5) кюветы (20 × 30 *см*) из органического стекла для окрашивания и промывания электрофореграмм; 6) рамка для сушки электрофореграмм; 7) воронки со стеклянным фильтром; 8) микроавтоматические пипетки или тарированные капельницы; 9) компаратор со стеклянными гнездами; 10) ФЭК-Н-57 с оптическими приставками и микрокюветами; 11) звездчатый диализатор; 12) нивелировочный столик. Относительно размерности см. [37].

Изготовление прибора [20]. Прибор выполнен из плексигласа (толщина листа 0,5 *см*). Он состоит из лотка с двойным дном, двух электродных отделов, двух вставочных «хлорсеребряных» электродов (Ag/AgCl/NaCl) и крышки. Внутренние размеры лотка составляют 40 × 12 × 5 *см*. Пространство, образованное двойным дном, служит для пропускания холодной воды или воздуха с целью охлаждения блока во время опыта. Каждый электродный отдел разделен перегородкой на две камеры: внешнюю — соединительную и внутреннюю — электродную.

Электродная камера имеет размеры 4,5 × 22 × 9 *см*, а соединительная — 2,5 × 22 × 9 *см*. Вся установка размещается на пластине из плексигласа, которая ставится на нивелировочный столик. Соединительные кюветы имеют специальные отверстия для выравнивания уровня электролита, а отверстия в электродных кюветах дают возможность применять в случае необходимости проточный буфер. Съемные неполяризующиеся электроды состоят из рамки, выполненной из плексигласа, свитой в спираль серебряной проволоки диаметром 2—3 *мм* и стеклянной трубки для подслаивания насыщенного раствора NaCl. Для хлорирования электродов используется выпрямитель типа УИП. Процесс протекает в растворе разведенной соляной кислоты, подсобным электродом служит толстая проволока из красной меди; в цепь вводится дополнительное сопротивление 300 *ом*. Хлорирование электродов продолжается в течение 22 час. при силе тока 100 *ма* и напряжении 40 *в*. Электроды хранятся под слоем дистиллированной воды в затемненном сосуде.

Подготовка и проведение опыта. В лотке, предварительно выложенном полиэтиленовой пленкой, формируется крахмальный блок, пропитанный буферным раствором (см. ниже). В крахмальном блоке делается углубление [15], в которое вносится диализированный раствор белка, предварительно смешанный с крахмалом. Блок закрывается плотной крышкой с прокладкой из полиэтиленовой пленки. Электродные и соединительные кюветы заполняются буферным раствором, вставляются электроды, подслаивается насыщенный раствор хлористого натра, выравнивается уровень электролита и включается электрический ток. Все операции (диализ, промывка крахмала, формирование блока, заполнение соединительных и электродных кювет) проводятся с одним и тем же буферным раствором (мединал-HCl буфер, pH 8,6, ионная сила 0,05).

Подготовка крахмала заключается в многократном промывании его путем декантации (8—10 раз) водопроводной, а затем дистиллированной водой. После промывания крахмал высушивается на воздухе или в термостате при 37—40°. Лучше сразу готовить большие количества крахмала, с тем чтобы была возможность проводить опыты с одним и тем же образцом носителя. Перед опытом анализируемый белковый раствор необходимо диализировать для удаления ионов, не содержащихся в буферном растворе, используемом для проведения электрофореза. Диализ проводится в звездчатом диализаторе при температуре +4°. Обычно бывает достаточно пропустить 500—600 *мл* мединал-HCl буферного раствора в течение 5—6 час.

Для формирования блока берется навеска крахмала, исходя из размеров лотка и высоты слоя носителя. Например, при высоте блока 0,9 *см*, длине лотка 40 *см* и ширине 12 *см* объем носителя равен 432 *см*³. Необходимая навеска сухого крахмала для получения такого блока составляет 75% от величины объема, т. е. 324 *г*. Взвешенный крахмал дважды или трижды промывается мединал-HCl буфером путем взбалтывания и декантации после полного

оседания частиц. Промытый буферным раствором влажный крахмал снова размешивается в таком количестве буфера, чтобы получить густую, но способную течь суспензию, которая и выливается в лоток, выложенный влажной полиэтиленовой пленкой. Предварительно прибор устанавливается в строго горизонтальном положении. Когда частицы крахмала осядут, избыток буфера отсасывают при помощи фильтровальной бумаги, наложенной на оба конца блока. Буфер удаляется до тех пор, пока консистенция крахмального блока будет позволять вырезать и удалить полоску крахмала для внесения белкового раствора. Обычно траншея делается на расстоянии 18 *см* от катодного конца блока. Предварительно рассчитывается ширина вырезаемой траншеи, исходя из ее длины, объема исследуемого раствора и высоты крахмального блока. При этом учитывается, что объем белкового раствора после добавления сухого крахмала увеличивается в полтора раза. Обычно для фракционирования 0,54 *мл* сыворотки крови человека в описанном выше аппарате при высоте блока 0,9 *см* и длине траншеи 3 *см* ширина ее составляла 0,3 *см* (что было совершенно достаточно). Извлеченную из блока полоску крахмала сначала подсушивают фильтровальной бумагой, а затем смешивают с образцом исследуемого белка. Когда крахмал приобретает желаемую консистенцию, его вносят в траншею и закрывают блок крышкой, внутренняя поверхность которой выложена влажной полиэтиленовой пленкой (см. [15]).

После того как подготовка блока закончена, электродные и соединительные кюветы заполняют буфером, выравнивают уровень электролита при помощи сифонной трубки. Контакт между соединительными и электродными кюветами осуществляется при помощи пропитанной буферным раствором фильтровальной бумаги. В прибор вставляются электроды и затем через стеклянную трубку в каждую из электродных кювет вливается по 70—100 *мл* насыщенного раствора поваренной соли. Для охлаждения крахмального блока весь прибор помещается в холодную комнату или же через холодильную камеру лотка пропускается охлажденная вода при помощи водоструйного насоса.

Продолжительность электрофоретического фракционирования, напряжение и сила тока в каждом конкретном случае подбираются экспериментально. Необходимо учитывать, что при увеличении силы тока свыше 60 *ма* часто возникают трудности в отведении выделяемого тепла, что может привести к денатурации белка. Увеличение времени электрофореза более 25 час. ухудшает фракционирование ввиду диффузии электрофоретических зон. Для хорошей воспроизводимости результатов необходим подбор таких условий, которые обеспечивают постоянство силы тока в крахмальном блоке в течение всего опыта. Хорошее фракционирование в описанных выше условиях наблюдается при напряжении 450 *в*, силе тока 40 *ма* в течение 22 час. По окончании электрофореза с крахмального блока снимается крышка и полиэтиленовая пленка. Для определе-

ния локализации электрофоретических зон на крахмал кладется отрезок фильтровальной бумаги, который впитывает буферный раствор и разделенные фракции белка. Полученный отпечаток обрабатывается таким же образом, как и электрофореграммы при электрофорезе на бумаге.

После определения локализации электрофоретических зон нужная фракция белка элюируется из крахмала и подвергается соответствующему анализу. Характер распределения белковых фракций может быть также установлен путем разрезания блока на 40 равных по объему участков и элюции белка буферным раствором с последующим определением его количества. Для этого блок крахмала приподнимают за выступающие края полиэтиленовой пленки и осторожно переносят на стекло. Сверху кладут другое стекло с подклеенной миллиметровой бумагой, блок переворачивают, удаляют верхнюю стеклянную пластинку и полиэтиленовую пленку. Блок выравнивают в отношении миллиметровки; исходя из длины траншеи, обрезают и удаляют его края, не содержащие белка. После этого слой носителя быстро разрезают на поперечные участки шириной 1 *см*. Каждую полоску крахмала переносят в пробирку и суспендируют в буферном растворе. При высоте блока 0,9 *см* и длине траншеи 3 *см* к каждому отрезанному участку блока добавляют по 1 *мл* буфера. Содержимое пробирки перемешивают, после осаждения крахмала элюат отделяют фильтрованием на воронках со стеклянным фильтром и в нем проводят предварительное определение белка с целью установления локализации, нужной белковой фракции, а также для определения величины необходимого в последующем разведении элюата в зависимости от концентрации содержащегося белка. Для полноты извлечения белка влажный крахмал дополнительно промывают (дважды по 0,5 *мл* буфера) на воронке со стеклянным фильтром. Количественный анализ фракций на содержание белка осуществляется при помощи ультрамикроэкспресс-метода [20]. Калибровочная кривая строится на основании ряда разведений дважды перекристаллизованного альбумина лошадиной сыворотки. Исходя из значений полученной оптической плотности и данных калибровочной кривой, рассчитывается содержание белка в 1 *мл* элюата. Для определения общего содержания белка в каждой фракции и количественной оценки всего опыта определяется полный объем жидкой фазы (*v*), который принимается равным сумме одной трети объема влажного крахмала и объема буфера, использованного для суспендирования крахмала и его промывания [23]. Умножая количество белка в 1 *мл* элюата на величину полного объема жидкой фазы (*v*), получаем общее содержание белка в каждой фракции. Сумма этих показателей по всем 40 фракциям должна быть близкой по своему значению исходному количеству белка, подвергнутого электрофорезу. Пример расчета содержания белка по длине крахмального блока при фракционировании 0,54 *мл* сыворотки человека в описанных выше условиях приведен **в таблице.**

Электрофоретическое фракционирование сыворотки крови человека в крахмальном блоке

Номер фракции	Разведение пробы	Оптическая плотность пробы *	Оптическая плотность пробы, обусловленная белком	Содержание белка, *мг*: в 1 *мл* пробы	Содержание белка, *мг*: во всей фракции, *v* — 2,9
1	—	0,044	—	—	—
2	—	0,037	—	—	—
3	—	0,123	0,082	0,070	0,203
4	—	0,307	0,266	0,311	0,901
5	1/5	0,176	0,135	0,693	2,010
6	—	0,235	0,194	0,207	0,600
7	—	0,206	0,165	0,172	0,498
8	—	0,076	0,035	0,032	0,092
9	—	0,122	0,081	0,070	0,203
10	—	0,147	0,106	0,100	0,290
11	—	0,182	0,141	0,141	0,408
12	1/5	0,141	0,100	0,472	1,370
13	—	0,075	0,034	0,032	0,092
14	—	0,074	0,033	0,032	0,092
15	—	0,073	0,032	0,032	0,092
16	—	0,124	0,083	0,070	0,203
17	—	0,147	0,106	0,100	0,290
18	—	0,177	0,136	0,138	0,400
19	—	0,233	0,192	0,200	0,580
20	1/5	0,224	0,183	0,965	2,800
21	—	0,180	0,139	0,140	0,406
22	—	0,075	0,034	0,032	0,092
23	—	0,122	0,081	0,070	0,203
24 **	—	0,147	0,106	0,100	0,290
25	1/5	0,162	0,121	0,600	1,720
26	—	0,179	0,138	0,140	0,406
27	—	0,180	0,139	0,140	0,406
28	—	0,147	0,106	0,100	0,290
29	1/5	0,129	0,088	0,400	1,150
30	—	0,264	0,223	0,240	0,696
31	—	0,122	0,081	0,070	0,203
32	1/5	0,259	0,218	1,170	3,393
33	1/15	0,285	0,244	0,120	11,970
34	1/5	0,199	0,158	0,825	2,392
35	—	0,324	0,283	0,344	0,997
36	—	0,038	—	—	—
37	—	0,044	—	—	—
38	—	0,039	—	—	—
39	—	0,046	—	—	—
40	—	0,042	—	—	—

* Элюат, полученный из чистого влажного крахмала, дает положительную реакцию Лоури. Среднее значение этого фона, рассчитанное из проб 1, 2, 36, 37, 38, 39 и 40, составляет 0,041.

** Внесено белка в блок: 40 *мг*. Получено после элюирования 35,74 *мг*.

При исследовании изоферментного спектра сыворотки в полученных элюатах проводится определение ферментной активности (лактатдегидрогеназа, фосфомоноэстераза I и II, глутамино-аланиновая и глутамино-аспарагиновая трансаминаза и т. д.) общепринятыми методами [20]. Желательно, чтобы эти методы, помимо других достоинств, были пригодны для серийных определений, обладали высокой чувствительностью и точностью. Результаты определения ферментной активности пересчитываются таким же образом, как и при определении белка.

При достаточной стандартизации условий электрофоретическое фракционирование сывороточных белков и ферментов в крахмальном блоке во многих отношениях не уступает другим методам зонального электрофореза. Используемый в качестве носителя картофельный крахмал почти не адсорбирует белка, вполне доступен и удобен в работе. К недостаткам метода следует отнести следовой эффект вследствие проникновения низкомолекулярных белков внутрь набухших крахмальных зерен, а также присутствие в элюате из крахмала ряда примесей (растворимые углеводы, вещества, дающие положительную нингидриновую реакцию и поглощающие в ультрафиолетовой области, и т. д.).

Метод определения липолитических ферментов [24]

Принцип. Предлагаемый метод является модификацией метода Gordon a Cherkes [22], в основе которого лежит титрометрическое определение количества НЭЖК нейтральных эфиров жирных кислот, освобожденных при гидролитическом расщеплении глицеридов субстрата за время инкубации при 37° с гомогенатом исследуемой ткани.

Особенностью метода является применение магнитных микромешалок для равномерного и постоянного перемешивания смеси во время инкубации и использование микротитрования НЭЖК при помощи горизонтальных микробюреток [25], что позволяет уменьшить количество титруемой жидкости и увеличить точность метода (за счет возможности постановки параллельных проб при работе с небольшими количествами жировой ткани, получаемыми при биопсии).

Метод позволяет одновременно определить 2 липолитических фермента — липазу[1] и липопротеидлипазу — в одной навеске ткани.

Реактивы: 1) фосфатный буфер Кребса — Рингера pH 6,8; 2) бычий сывороточный альбумин; 3) 50%-ная кокосовая эмульсия «Эдиол»; 4) 1 *M* сернокислый аммоний; 5) 0,2 *M* фтористый натрий; 6) 1 *M* хлористый натрий; 7) гептан; 8) изопропиловый спирт; 9) 1 *M* серная кислота; 10) натриевая щелочь — 0,01 *M* и 33%; 11) 0,1%-ный тимолблау.

---

[1] КФ 3.1.1.3.

Оборудование: 1) магнитная мешалка (ММ-2); 2) термостат; 3) горизонтальная микробюретка [20].

Техника. Жировики эпидидимиса белых крыс-самцов после их декапитации или кусочки подкожножировой ткани людей, полученные при аппендэктомии или биопсии, сразу же помещают на лед, быстро взвешивают 2 навески (100—200 *мг*) и опускают их во флаконы (50 *мл*) с фосфатным буфером Кребса — Рингера (10 *мл*), промывают и быстро гомогенизируют в стеклянном гомогенизаторе при охлаждении с добавлением того же буфера (из расчета 2 *мл* на 100 *мг* ткани). Полученный гомогенат количественно переносят в 2 флакона со средой для инкубации, приготовление которой описывается ниже, в соотношении 1 : 1. Из каждого флакона с инкубационной смесью сразу же отбирают по 0,5 *мл* на исследование исходного количества НЭЖК, к смеси добавляют ингибиторы для подавления одной из липаз (1 *М* хлористый натрий — для подавления активности липопротеидлипазы и 0,2 *М* фтористый натрий — для подавления активности липазы), доводят добавлением 0,1 н. раствора NaOH до нужного pH (6,8 — для определения активности липазы и 8,5 — для определения активности липопротеидлипазы), опускают во флаконы вплавленные в стекло стальные иголочки [20], закрывают пробками и помещают в поле магнитной мешалки, установленной в воздушном термостате. Для этого на рабочей поверхности магнитной мешалки (ММ-2) укрепляют прокладку из пенопласта с гнездами для плоскодонных флаконов, расположенных по окружности на одинаковом расстоянии от центра мешалки. Инкубация проводится в течение 2 час. при 37°. По окончании инкубации проверяют pH смеси (изменения допустимы в пределах ± 0,2) и вновь отбирают по 0,5 *мл* инкубационной смеси.

Приготовление субстратов. При определении активности липазы субстратом фермента являются собственно липиды, т. е. жир самой ткани. Готовится следующая смесь: 5%-ный бычий сывороточный альбумин, являющийся акцептором освобождающихся при инкубации жирных кислот, в 0,1 *М* фосфатном буфере Кребса — Рингера pH 6,8. Все операции в дальнейшем производятся с данным буфером.

При определении активности липопротеидлипазы можно пользоваться двумя методами. В первом в качестве субстрата используется стандартная 50%-ная эмульсия кокосового масла — эдиол. Готовится следующая смесь: 1) 2%-ный сывороточный альбумин; 2) эдиол, разведенный водой в соотношении 1 : 10; 3) 1 *М* сернокислый аммоний в буфере Кребса — Рингера. Эта смесь прединкубируется с 10%-ной свежей сывороткой крови человека при 37° в течение одного часа при постоянном перемешивании магнитной мешалкой. Затем этот субстрат смешивают с гомогенатом ткани, как было описано выше, и проводят инкубацию. По второму методу (в виду дефицитности эдиола) смесь, состоящую из гомогената, 2%-ного сывороточного альбумина и 1 *М* сернокислого аммония, прединкубируют со свежей нормальной сывороткой человека в тех

же условиях, что и с эдиолом. Затем отбирают 0,5 *мл* для определения титра НЭЖК, доводят pH до 8,5, добавляют 0,2 *М* фтористый натрий для подавления активности липазы и вновь ставят на инкубацию при 37° в течение 2 час. Таким образом, во втором случае субстратом липопротеидлипазы являлись собственные липиды, прединкубированные с белками сыворотки крови.

Для исследования активации липолитических ферментов физиологическими активаторами (адреналином, активирующим липазу, и гепарином, активирующим липопротеидлипазу) неизмельченные навески жировой ткани (по 100 *мл*) быстро помещают в 4 приготовленных флакона с фосфатным буфером Кребса—Рингера с добавлением или без добавления 3 *ед/мл* адреналина или 30 *мкг/мл* гепарина и ставят в термостат при 37° на инкубацию в течение 1 часа. По окончании инкубации ткань извлекают из флаконов, промывают в том же буфере и быстро гомогенизируют. Далее определение ведется так же, как и без активации физиологическими активаторами.

Определение неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК) в инкубационной среде. Экстрагирование и титрометрическое определение количества жирных кислот, освободившихся за время инкубации, производят методом Dole [21]. В пробирку с притертой пробкой с 0,5 *мл* инкубационной смеси, взятой до или после инкубации, добавляют 2,5 *мл* экстрагирующей жидкости (изопропиловый спирт, гептан, 1 *М* раствор серной кислоты в соотношении 40 : 10 : 1). Смесь взбалтывают в течение 2 мин., добавляют 13,5 *мл* гептана и 1 *мл* бидистиллированной воды. Вновь взбалтывают 3 мин. и дают отстояться. Из верхнего гептанового слоя 0,5 *мл* переносят в узенькие пробирочки емкостью 1,5 *мл*, добавляют 0,5 *мл* 0,01%-ного раствора тимолблау и титруют 0,01 *М* раствором натриевой щелочи при продувании струи воздуха, предварительно пропущенной через 33%-ный раствор едкого натра. Параллельно ставят контроль на реактивы (0,5 *мл* гептана +0,5 *мл* 0,01 *М* раствора тимолблау). Титрование проводится при помощи горизонтальной микробюретки, что позволяет вдвое уменьшить количество титруемой жидкости и реактивов и избежать ошибки натекания. Активность выражают в *мкэкв* НЭЖК/*г* сырой ткани [21].

Калибровочную кривую строят по стандартному раствору пальмитиновой кислоты (12,8 *мг* пальмитиновой кислоты на 100 *мл* гептана, что соответствует концентрации 0,5 *мкэкв/мл*).

Норма (*мкэкв/г*):

	Люди	Крысы
Липаза	2—3	5—7
Липопротеидлипаза	1,5—2	2—4

Микроэкспресс-метод определения активности ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы в крови при помощи меланжерного набора

(Ацетилхолинэстераза КФ 3.1.1.7; Бутирилхолинэстераза КФ 3.1. 1.8)

Принцип. Метод основан на установлении времени, необходимого для расщепления 30% взятого в реакцию эфира холина: бутирилхолина — при определении активности бутирилхолинэстеразы и ацетилхолина — при определении активности ацетилхолинэстеразы. Продолжительность реакции определяется по скорости изменения цвета индикатора в стандартном буферном растворе, происходящего вследствие освобождения кислоты при гидролизе эфиров.

Колориметрические определения проводятся при помощи сравнения со стандартными растворами, цвет которых соответствует начальной и конечной окраскам реакционной смеси. В качестве индикатора используются сравнительно концентрированные растворы бромтимолового синего (которые перекрывают алый цвет гемолизата). Бромтимоловый синий меняет окраску от синего к желтому цвету при изменении pH в интервале 7,6—6,0.

Активность холинэстераз выражается количеством микромолей эфира холина, расщепленного за минуту 1 *мл* крови. Все реактивы представлены в сухом ампулированном виде и заключены в компактный набор [20], приведение которого в готовность занимает несколько минут.

Общее время определения занимает 20—30 мин. и может быть проведено непосредственно у постели больного, в операционной, а также при полном отрыве от лабораторной базы. Определение по данному методу не требует получения сыворотки и для полного анализа достаточно 0,05 *мл* цельной крови.

Реактивы: 1) сухая индикаторно-буферная смесь готовится путем растирания в ступке 1 *г* бромтимолового синего с 16 *мл* 0,1н. раствора едкого натра до полного растворения. К полученному раствору добавляют 1,6 *г* порошкообразной H_3BO_3 и 0,8 *г* $NaHCO_3$. Смесь растирают в ступке и высушивают в токе теплого воздуха до образования порошка кофейного цвета. Из данной смеси готовят рабочий индикаторно-буферный раствор, для чего 30 *г* смеси растворяют в 100 *мл* дистиллированной воды. Полученный раствор имеет насыщенно синий цвет (pH его доводят при помощи 0,1н. раствора NaOH до 8,5). Он служит для приготовления первого и второго колориметрических стандартов, а также субстратных растворов. При хранении стоек; 2) щавелевая кислота фасуется в пенициллиновые склянки в виде 0,05 н. раствора по 0,3 *мл* и затем высушивается путем упаривания воды при невысокой температуре (50—70°) в сушильном шкафу. Используется для приготовления второго колориметрического стандарта, для чего в склянку с сухой щавелевой кислотой (см. выше) вносят 10 *мл* рабочего индикаторно-буферного раствора. Полученный раствор имеет желтый цвет.

Раствор стоек при хранении в закрытой склянке в течение 2 недель (зеленый цвет указывает на непригодность раствора к работе); 3) ацетилхолинхлорид расфасован в широкие ампулы с плоским дном, объемом 3—5 *мл*, каждая из которых содержит по 10 *мкмолей* эфира. Расфасовка производится разливом по ампулам 1%-ного водного раствора ацетилхолинхлорида в количестве 0,2 *мл* и последующим высушиванием сублимационным методом.

Для приготовления субстратного раствора при определении активности ацетилхолинэстеразы в ампулу вносят по 2 *мл* рабочего индикаторно-буферного раствора, при этом рабочий раствор не должен позеленеть или пожелтеть (что указывало бы на разложение субстрата и непригодность раствора к использованию). Раствор годен для употребления в течение 1—2 час. после приготовления; 4) бутирилхолинйодид расфасован в ампулы по 10 *мкмолей*, для чего в каждую ампулу разлито по 0,2 *мл* 1,57% водного раствора бутирилхолинйодида и произведена сушка его сублимационным методом. Для приготовления субстратного раствора при определении активности бутирилхолинэстеразы в ампулу вносят по 2 *мл* рабочего индикаторно-буферного раствора. Цвет раствора насыщенно синий. К данному раствору предъявляются те же требования, что и к раствору ацетилхолинхлорида.

Оборудование. Набор для определения холинэстеразной активности меланжерным методом, включающий, помимо перечисленных ампулированных реактивов, следующее: 1) термостат-компаратор из органического стекла со штативом [20]; 2) меланжеры для подсчета лейкоцитов с дополнительной меткой 0,25, соответствующей $^{1}/_{40}$ объема меланжера; 3) термометр химический со шкалой на 50°; 4) резиновую трубку с мундштуком для насасывания жидкости в меланжеры; 5) резиновые колпачки для закрывания меланжеров.

Т е х н и к а. Из прокола кожи пальца набирают кровь в 4 меланжера до метки 0,25, а затем дополняют до метки 1,1 (так, как это делают при определении количества лейкоцитов) следующими растворами:

меланжер 1 — рабочим индикаторно-буферным раствором;

меланжер 2 — раствором для приготовления второго колориметрического стандарта;

меланжер 3 — раствором из ампулы с ацетилхолинхлоридом;

меланжер 4 — раствором из ампулы с бутирилхолинйодидом.

Встряхиванием или вращением производят тщательное смешивание их содержимого, затем меланжеры переворачивают верхним концом вниз и закрывают эти концы резиновыми колпачками. При надевании колпачков их предварительно сдавливают таким образом, чтобы после надевания жидкость заполняла капиллярную часть меланжера. Меланжеры тотчас помещают в гнезда штатива термостата-компаратора, заполненного водой, нагретой до 40°, и замечают время [1]. При этом закрытые колпачками концы меланжеров

[1] Температуру воды в термостате вплоть до окончания реакции следует поддерживать с точностью ± 1°.

находятся внизу, под водой, а открытые концы — над уровнем воды. Расширенные части меланжеров должны быть полностью покрыты водой и располагаться на одинаковом уровне на фоне белой поверхности вертикальной плоскости пластмассового штатива.

В результате в меланжерах образуются смеси индикаторных растворов с кровью, при этом темно-синий цвет содержимого меланжера 1 соответствует исходному цвету реакционной смеси и служит первым колориметрическим стандартом. Коричневый цвет содержимого меланжера 2 соответствует цвету реакционной смеси после расщепления 30%-ного субстрата и является вторым колориметрическим стандартом.

Техника определения холинэстеразной активности сводится к регистрации времени, прошедшего от момента смешивания крови с раствором субстратов до момента уравнивания цвета реакционной смеси с окраской второго стандартного раствора. Колориметрические сравнения проводятся визуально в термостате, на белом фоне задней стенки штатива.

Расчет активности холинэстеразы производят по формуле:

$$A_{хэ} = \frac{1{,}5 \cdot 40}{T},$$

где $A_{хэ}$ —активность холинэстеразы, выраженная количеством микромолей эфира холина, расщепленного 1 *мл* крови за минуту; T— время расщепления ацетилхолинхлорида или бутирилхолинйодида в минутах; 1,5 — коэффициент, соответствующий расщеплению 30%-ного эфира холина, взятого в реакционную смесь; 40 — разведение крови в меланжерах.

По данной формуле можно рассчитать суммарную и неспецифическую активность холинэстераз. В первом случае в значении T указывают время расщепления ацетилхолинхлорида, а во втором — время расщепления бутирилхолинйодида.

Активность специфической холинэстеразы рассчитывают по формуле:

$$A = A_3 - 0{,}5\ A_2,$$

где A — активность специфической холинэстеразы, выраженная в микромолях ацетилхолина, расщепленного 1 *мл* крови за минуту; A_3 — суммарная активность по ацетилхолинхлориду; A_2 — активность неспецифической холинэстеразы по бутирилхолинйодиду; 0,5—коэффициент, отражающий взаимоотношение скорости гидролиза ацетилхолина и бутирилхолина неспецифической холинэстеразой в сыворотке крови человека.

Величина колебаний холинэстеразной активности в крови здоровых людей (при 38°) в микромолях эфира холина в минуту будет составлять: для суммарной активности от 4 до 7,9, в среднем 5,9; для активности неспецифической холинэстеразы — от 3,2 до 7,6, в среднем 5,4; для активности специфической холинэстеразы — от 1,6 до 4,8, в среднем 3,2.

Микроэкспресс-метод определения активности фосфомоноэстеразы 1 и 2 [27][1]

Принцип основан на способности фосфомоноэстераз 1 и 2 при определенных условиях гидролизовать эфирную связь в *п*-нитрофенилфосфате. В результате освобождается *п*-нитрофенол, дающий в щелочной среде желтое окрашивание. Интенсивность этой окраски отражает активность фермента.

Активность фосфомоноэстераз выражается количеством микромолей *п*-нитрофенилфосфата, расщепленного за 1 мин. 1 *мл* крови.

Для определения активности фермента достаточно 0,04 *мл* сыворотки или плазмы крови. Для исследования 10 образцов крови требуется 60—90 мин. Метод удобен для проведения серийных проб.

Реактивы: 1) раствор *п*-нитрофенола: 0,014 *г* *п*-нитрофенола растворяют в 10 *мл* 0,1н. раствора углекислой соды (Na_2CO_3). 1 *мл* полученного раствора содержит 10 *мкмолей* *п*-нитрофенола.

Этот раствор используют для приготовления ряда разведений при построении калибровочной кривой (0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1 *мкм* в 1 *мл* раствора, см. рисунок). Все разведения готовят на 0,1н. растворе углекислой соды; 2) субстрат. Готовят 0,45%-ный раствор *п*-нитрофенилфосфата натрия в 0,001н. растворе соляной кислоты. Для удаления свободного *п*-нитрофенола полученный раствор взбалтывают в делительной воронке с равным объемом эфира 2—3 раза до полного обесцвечивания. Остатки эфира удаляют аэрированием. При определении активности фосфомоноэстеразы 1 к полученному раствору *п*-нитрофенилфосфата натрия прибавляют 1н. раствора аммиачного буфера (pH 10,1) в количестве 1 *мл* на каждые 9 *мл*. При определении активности фосфомоноэстеразы 2 на каждые 9 *мл* субстрата прибавляют 1 *мл* цитратного буфера. Забуференные субстраты хранят в склянке из темного стекла в холодильнике. Если субстраты при хранении окрашиваются в желтый цвет, то они считаются непригодными для работы и заменяются новыми. Обычно субстраты сохраняются 5—6 дней.

В случае отсутствия *п*-нитрофенилфосфата натрия можно использовать *п*-нитрофенилфосфат бария, который в процессе приготовления субстрата переводят в натриевую соль. Для этого к навеске *п*-нитрофенилфосфата бария, соответствующей получению 0,9%-ного раствора, прибавляют порциями по 20 *мл* 0,001н. раствор соляной кислоты и растирают в фарфоровой ступке в течение 10 мин. Затем к каждым 100 *мл* полученного раствора прибавляют 1,5—2 *мл* насыщенного раствора сернокислого натрия и через 5 мин. фильтруют в делительную воронку. Дальнейшая обработка аналогична приготовлению субстрата из *п*-нитрофенилфосфата натрия; 3) 1н. аммиачный буфер (pH 10,1) : 1н. раствор гидроокиси аммония смешивают с 1н. раствором хлористого аммония в соотношении 4 : 1; 4) 1 *М* цитратный буфер (pH 4,95) : 31 *г* безводной лимонной кислоты растворяют в 307 *мл* 1н. раствора едкого натра, объем до

[1] См. щелочная и кислая фосфатазы.

водят до 500 *мл* дистиллированной водой без CO_2; 5) 0,1%-ный раствор хлористого магния.

Оборудование: 1) плавающий компаратор и водный термостат; 2) микроавтоматические пипетки со сменными мерными капиллярами или тарированные капельницы; 3) оптические приставки с микрокюветами к ФЭК-Н-57.

Т е х н и к а. В гнезда плавающего компаратора, помещенного в водяной термостат (40°), вносят по 0,04 *мл* (2 капли) сыворотки или плазмы, предварительно разведенной в 5—10 раз и по 0,02 *мл* (1 капля) 0,1%-ного раствора хлористого магния (5). После 10-минутного прогревания в эти гнезда прибавляют по 0,04 *мк* (2 капли) забуференного субстрата, содержимое гнезд быстро перемешивают, компаратор закрывают крышкой и фиксируют время начала реакции. Инкубируют 30 мин. После инкубации компаратор помещают на лед, в каждое гнездо вносят по 0,02 *мл* (1 капля) 0,1н. раствора едкого натра. Через 3—5 мин. реакционные смеси, непосредственно из гнезд компаратора, забирают в микрокюветы и колориметрируют с синим светофильтром № 2 (максимум поглощения при 413 *ммк*). Одновременно проводят контрольные определения качества забуференного раствора субстрата: в два гнезда плавающего компаратора помещают по 0,04 *мл* раствора субстрата, по 0,04 *мл* дистиллированной воды и по 0,02 *мл* 0,10%-ного раствора хлористого магния (5). Контроль на оптическую плотность раствора плазмы или сыворотки: в гнезда плавающего компаратора помещают по 0,04 *мл* плазмы или сыворотки, по 0,04 *мл* буфера (3), разведенного в 10 раз, и по 0,02 *мл* 0,1%-ного раствора хлористого магния. В дальнейшем контрольные пробы инкубируют и обрабатывают таким же образом и в те же сроки, что и исследуемые пробы. Контроль на оптическую плотность раствора плазмы или сыворотки ставится для каждой исследуемой крови отдельно.

При расчете ферментной активности экстинкции контрольных проб вычитают из экстинкции опытной пробы

$$E_{ф} = E_{оп} - (E_{сп} + E_{суб}),$$

где $E_{ф}$ — экстинкция, соответствующая ферментной активности исследуемого раствора; $E_{оп}$ — экстинкция опытной пробы; $E_{сп}$ — экстинкция контрольной пробы раствора сыворотки или плазмы крови; $E_{суб}$ — экстинкция контрольной пробы раствора субстрата.

Найденное значение экстинкции, отражающее фосфомоноэстеразную активность исследуемого раствора, сопоставляют с калибровочной кривой и находят количество *п*-нитрофенола, освободившегося в пробе за 30 мин. ферментативного гидролиза (*а*).

$$A_{ф} = \frac{a \cdot 3 \cdot б}{30},$$

где $A_{ф}$ — активность фосфомоноэстеразы, выраженная количеством микромолей *п*-нитрофенилфосфата, расщепленного за 1 мин. 1 *мл*

крови; *б* — разведение крови; *3* — разведение в гнезде; 30 — время инкубации в минутах.

Активность фосфомоноэстеразы 1 крови взрослых практически здоровых людей в среднем равна 0,009 *мкмоля* *п*-нитрофенил-фосфата (*мл* крови в 1 мин.). Пределы колебаний активности данного фермента составляют от 0,003 до 0,015 *мкмолей* *п*-нитрофенилфосфата (*мл* крови) в 1 мин. Активность фосфомоноэстеразы 2 в сыворотке крови в норме практически не обнаруживается.

Примечание. Очень большое значение для получения сопоставимых результатов определения активности фосфомоноэстеразы 1 имеет качество субстрата. Вновь полученный *п*-нитрофенилфосфат необходимо проверять на содержание общего и неорганического фосфора. Забуференный раствор субстрата должен содержать 30 *мг%* общего фосфора и лишь следы неорганического фосфора.

Микроэкспресс-метод определения активности амилазы [28]

Определение активности амилазы основано на фотометрическом измерении падения концентрации крахмала после обработки реакционной смеси раствором йода.

К особенностям метода относится применение оригинальной техники микроэкспрессного анализа, позволяющей довести количество сыворотки крови для одного определения до 0,002 *мл*.

Метод удобен для проведения серийных анализов. Для исследования амилазной активности 10 образцов сыворотки требуется 60—90 *мин*.

Реактивы: 1) основной йодный реактив: 0,25 *г* кристаллического йода растирают в фарфоровой ступке с 0,66 *г* йодистого калия и 20 *мл* дистиллированной воды. Раствор стоек; 2) рабочий раствор йода готовят разведением основного йодного реактива в 50 раз 0,20н. раствором соляной кислоты. Рабочий раствор йода готовят непосредственно перед опытом; 3) фосфатный буфер (pH 6,9): 0,1 *M* водные растворы NaH_2PO_4 и Na_2HPO_4 смешивают в соотношении 1 : 1 и разбавляют в 3 раза 0,1 *M* раствором хлористого натрия. Конечная концентрация буферного раствора —0,03 *M*; 4) 0,1%-ный раствор крахмала: 100 *мг* растворимого крахмала растирают с несколькими миллилитрами холодной дистиллированной воды и количественно переносят в кипящую воду. После охлаждения объем доводят до 100 *мл*. Раствор крахмала при хранении в холодильнике годен 3—5 дней.

Оборудование: 1) плавающий компаратор и водяной термостат; 2) микроавтоматические пипетки со сменными мерными капиллярами или тарированные капельницы [20]; 3) ФЭК-Н-57; 4) оптические приставки с микрокюветами к ФЭК-Н-57.

Техника. В гнездо плавающего компаратора вводят 0,02 *мл* (1 капля) сыворотки, предварительно разведенной в 40 раз, и 0,08 *мл* (4 капли) фосфатного буфера, компаратор закрывают крышкой и помещают в водяной термостат при температуре 38°.

После 10-минутного прогревания в гнездо компаратора вносят 0,02 *мл* (1 капля) крахмала, нагретого до той же температуры, содержимое гнезда перемешивают и замечают время начала реакции. Пробу инкубируют в течение 15 мин. Затем компаратор помещают на лед, а в гнездо прибавляют 0,02 *мл* (1 капля) рабочего раствора йода (2), содержимое гнезда тщательно перемешивают, забирают в микрокювету и колориметрируют с красным светофильтром № 8 при 656 *ммк*. Параллельно к каждой испытуемой пробе ставят контроль для замера начальной экстинкции крахмала, введенного в реакционную смесь. Контрольные пробы ставят так же, как и опытные пробы, но крахмал в них вводят только после инкубации одновременно с внесением йода.

При расчете ферментной активности амилазы экстинкцию опытной пробы вычитают из экстинкции контрольной пробы:

$$E_ф = E_к - E_{оп},$$

где $E_ф$ — экстинкция, соответствующая ферментной активности исследуемого раствора; $E_к$ — экстинкция контрольной пробы; $E_{оп}$ — экстинкция опытной пробы.

Найденное значение экстинкции, отражающее амилазную активность исследуемого раствора, сопоставляют с калибровочной кривой и находят количество крахмала, расщепившегося в пробе за 15 мин. ферментативного гидролиза (*a*):

$$A_{ам} = \frac{a \cdot в}{15},$$

где $A_{ам}$ — активность амилазы, выраженная количеством миллиграммов крахмала, расщепленного за минуту 1 *мл* крови: *в* — разведение крови; 15 — время инкубации в минутах.

Построение калибровочной кривой по стандартному раствору крахмала. Для построения калибровочной кривой в гнезда плавающего компаратора вносят по 0,08 *мл* фосфатного буфера (3), по 0,02 *мл* дистиллированной воды и по 0,02 *мл* раствора крахмала с постепенно повышающейся концентрацией (в пределах от 0,2 до 1,0 *мг* крахмала в 1 *мл* раствора). Компаратор закрывают крышкой и ставят в водный термостат на 25—30 мин. при температуре 38°, затем компаратор помещают на лед; в гнезда компаратора вносят по 0,02 *мл* рабочего раствора йода (2), тщательно перемешивают и через 3—5 мин. колориметрируют с красным светофильтром № 8.

Примечание. Для получения сопоставимых результатов определения активности амилазы очень большое значение имеет качество крахмала. Поэтому из ряда образцов растворимого крахмала следует отбирать крахмал, обладающий наилучшей растворимостью и дающий наивысшую интенсивность окраски с йодом (определяется на основании фотометрирования).

Величина колебаний амилазной активности крови у практически здоровых взрослых людей составляет от 0,100 до 0,570 *мг* крахмала, разложенного 1 *мг* крови в минуту (при средней арифметической 0,335).

Микроэкспресс-метод определения активности ацетилхолинэстеразы и неспецифической холинэстеразы в крови [29]

(Ацетилхолинэстераза КФ 3.1.1.7; неспецифическая холинэстераза КФ 3.1.1.8)

П р и н ц и п. Определение состоит в измерении времени, необходимого для расщепления 30% взятого в реакцию эфира холина: бутирилхолина — при определении активности бутирилхолинэстеразы и ацетилхолина — при определении активности ацетилхолинэстеразы. Продолжительность реакции определяется по времени, требуемому для изменения цвета индикатора в стандартном буферном растворе, происходящего вследствие освобождения кислоты при гидролизе эфиров. Колориметрические измерения проводятся при помощи стандартных растворов, цвет которых соответствует начальной и конечной окраске реакционной смеси. В качестве индикатора используются сравнительно концентрированные растворы бромтимолового синего (окраска которых перекрывает алый цвет гемолизата). Бромтимоловый синий меняет окраску от синего к желтому цвету при изменении pH в интервале 7,6—6,0.

В первом варианте активность холинэстераз выражается количеством микромолей эфира холина, расщепленного за минуту 1 *мл* крови.

Во втором варианте метода предусматривается фотометрическая оценка изменения оптической плотности реакционной смеси при помощи оптической приставки к ФЭК.

Р е а к т и в ы: 1) основной индикаторно-буферный раствор: 200 *мг* индикатора бромтимолового синего растирают в ступке с 4 *мл* 0,1н. раствора едкого натра. Синий раствор из ступки переносят в мерную колбу, емкостью 200 *мл*, ступку споласкивают несколько раз небольшими количествами воды, свободной от углекислоты; воду также сливают в мерную колбу. Сюда же прибавляют 16 *мл* 0,1н. раствора едкого натра и 50 *мл* 0,1 *М* раствора борной кислоты (в 0,1 *М* растворе хлористого калия), содержимое колбы доводят до метки дистиллированной водой (без углекислоты). Полученный раствор имеет синий цвет, pH 8,65—8,70. При хранении стоек; 2) рабочий индикаторно-буферный раствор. Одну часть основного индикаторно-буферного раствора смешивают с 4 частями воды (свободной от углекислоты), полученный раствор имеет насыщенно синий цвет и pH 8,65—8,70, он служит для приготовления первого и второго колориметрических стандартов, а также субстратных растворов. При хранении стоек; 3) индикаторно-буферный раствор для приготовления второго колориметрического стандарта: 9,85 *мл* рабочего индикаторно-буферного раствора (2) смешивают с 0,15 *мл* 0,1н. раствора соляной кислоты. Полученный раствор имеет зеленый цвет, при хранении стоек; 4) индикаторно-буферный раствор бутирилхолина (субстрат для определения активности бутирилхолинэстеразы): в маленьком стаканчике смешивают 1,8 *мл* рабочего индикаторно-буферного раствора (2) с 0,2 *мл* 1,57%-ного водного раствора бутирилхолинйодида (или 1,1%-ного раствора

бутирилхолинхлорида). Цвет раствора синий; 5) индикаторно-буферный раствор ацетилхолина (субстрат для определения активности ацетилхолинэстеразы): в маленьком стаканчике смешивают 1,8 *мл* рабочего индикаторно-буферного раствора (2) с 0,2 *мл* 1%-ного водного раствора ацетилхолинхлорида. Цвет раствора синий.

Растворы 4 и 5 готовят не ранее чем за час до проведения реакции. Ацетилхолинхлорид легко подвергается гидролизу, бутилхолинйодид более стоек. Свежеприготовленные растворы эфиров холина (1%-ный раствор ацетилхолина и 1,57%-ный раствор бутирилхолина) необходимо довести 0,02 н. раствором едкого натра до нейтральной реакции (до зеленой окраски) для удаления кислот, которые освобождаются при гидролизе данных эфиров. В качестве индикатора можно использовать раствор 2. Водные растворы ацетилхолинхлорида и бутирилхолинйодида годны в течение 7 дней при хранении в холодильнике.

Оборудование: 1) тарированные капельницы или микроавтоматические пипетки с мерными капиллярами; 2) плавающий компаратор с водяным термостатом; 3) при объективной регистрации — микрокюветы и оптическая приставка к ФЭК-Н-57.

Техника. Для определения бутирилхолинэстеразы плазму, разведенную физиологическим раствором в 20 раз, разводят еще в 5 раз. По 0,04 *мл* (2 капли) полученного раствора плазмы или сыворотки крови помещают в 3 гнезда плавающего компаратора, закрывают его крышкой и помещают в водяной термостат при температуре 38°. После 10—15 мин. прогревания в первое гнездо (левое), служащее первым колориметрическим стандартом, добавляют 0,04 *мл* (2 капли) раствора 2 (цвет синий), во второе гнездо (среднее), служащее вторым колориметрическим стандартом, добавляют 0,04 *мл* (2 капли) раствора 3 (цвет зеленый); в третье гнездо (правое), служащее опытной пробой, добавляют 0,04 *мл* (2 капли) раствора 4 (цвет синий). Содержимое гнезд перемешивают и замечают время начала реакции; фиксируют время, в течение которого происходит уравнивание окраски опытной пробы со вторым стандартом (среднее гнездо).

Расчет проводится по формуле;

$$A_{бх} = \frac{1,5 \cdot B}{T},$$

где $A_{бх}$ — активность бутирилхолинэстеразы, выраженная в микромолях эфира холина, разложенного 1 *мл* крови за минуту; B — общее разведение крови; T — продолжительность реакции в минутах; 1,5 — количество микромолей кислоты, введенное в стандарт 2, что соответствует расщеплению 30%-ного эфира холина в реакционной смеси.

Для взрослых, практически здоровых людей величина активности бутирилхолинэстеразы в крови колеблется в пределах от 2,7 до 7,1 (в среднем 4,9 *мкмоля* субстрата, разлагаемого 1 *мл* крови за минуту).

Для определения активности ацетилхолинэстеразы по 0,02 *мл* (1 капля) гемолизата крови[1] помещают в 3 гнезда компаратора, в эти же гнезда добавляют по 0,02 *мл* (1 капля) воды. Компаратор закрывают крышкой и помещают в водяной термостат при температуре 38°. После 10—15 мин. прогревания в первое гнездо (левое), служащее первым колориметрическим стандартом, добавляют 0,04 *мл* (2 капли) раствора 2 — цвет буро-коричневый, во второе гнездо (среднее), служащее вторым колориметрическим стандартом, добавляют по 0,04 *мл* (2 капли) раствора 3 — цвет красно-желтый; в третье гнездо (правое), служащее опытной пробой, добавляют 0,04 *мл* (2 капли) раствора 5 — цвет буро-коричневый.

Содержимое гнезд перемешивают и замечают время начала реакции. Концом реакции считают время, в которое происходит уравнивание окраски опытной пробы со вторым стандартом (среднее гнездо).

Расчет проводится по формуле:

$$A_{ax} = \frac{1{,}5 \cdot B}{T},$$

где A_{ax} — активность ацетилхолинэстеразы, выраженная в микромолях эфира холина, разложенного 1 *мл* крови за минуту; B — разведение эритроцитов в расчете на взятый для анализа объем крови; T — время реакции в минутах; 1,5 — количество микромолей кислоты, введенное в стандарт 2, что соответствует расщеплению 30%-ного эфира холина в реакционной смеси.

Для взрослых, практически здоровых людей величина активности ацетилхолинэстеразы крови колеблется в пределах от 1,7 до 3,2 (в среднем 2,4 *мкмоля* эфира холина, разлагаемого 1 *мл* крови за минуту).

По второму варианту метода (см. стр. 457) оценка холинэстеразной активности проводится в реакционных смесях, аналогичных описанным выше, по изменению их оптической плотности при помощи оптической приставки к ФЭК-Н-57 при красном светофильтре № 8 (длина волны 656 *ммк*).

Инкубация смеси также проводится в гнездах плавающего компаратора и через определенное время (при разведении крови 1 : 50— через 15 мин.) реакция останавливается прибавлением капли 0,5%-ного прозерина.

Ферментную активность определяют по предварительно составленной калибровочной кривой, показывающей изменение оптической плотности первого колориметрического стандартного раствора 1 (приготовленного на сыворотке, избранной за эталон) в зависимости от количества внесенной кислоты.

При проведении определения этим методом (т. е. на ФЭК-Н-57) точные результаты могут быть получены только при внесении поправки на буферную емкость исследуемого образца крови. Для

---

[1] Получение гемолизата крови см. Н. Н. Пушкина. Биохимические методы исследования. М., Медгиз, 1963, стр. 219—220.

этого оптическая плотность второго колориметрического стандартного раствора (2) сопоставляется с соответствующей точкой на калибровочной кривой. Величина расхождения между этими точками характеризует различия буферных емкостей эталонной и исследуемой сывороток крови. На основании ее вносится поправка в угол наклона калибровочной кривой при работе с данной сывороткой

Определение протеолитической активности желудочного сока микроэкспресс-методом [30]

П р и н ц и п. Метод основан на нефелометрическом определении количества казеина, не расщепленного желудочным соком при pH 2,5.

Р е а к т и в ы: 1) лимонная кислота; 2) 1н. раствор едкого натра; 3) 0,1н. раствор соляной кислоты; 4) 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты; 5) цитратный буфер, pH 2,5; готовят из реактива А и 0,1н. раствора соляной кислоты. Для приготовления 100 *мл* реактива А 2,1 *г* лимонной кислоты растворяют в небольшом количестве воды. К раствору добавляют 20 *мл* 1н. раствора едкого натра. Объем раствора доводят водой до 100 *мл*. Реактив А хранят в холодильнике. Цитратный буфер pH 2,5 (5) готовят перед определением путем смешивания 64 *мл* 0,1н. раствора соляной кислоты с 36 *мл* реактива А; 6) казеин очищенный. Для приготовления 100 *мл* основного раствора казеина 1 *г* казеина взбалтывают в 70 *мл* дистиллированной воды и при помешивании добавляют 10—12 *мл* 0,2н. раствора едкого натра до растворения казеина. Затем осторожно, по каплям, прибавляют 10—12 *мл* 0,1н. раствора соляной кислоты до pH 7,0. При хранении в холодильнике основной раствор казеина устойчив в течение месяца. Рабочий раствор казеина с концентрацией 1 *мг/мл* готовят перед определением путем разведения основного раствора в 10 раз цитратным буфером (5), pH — 2,5.

Оборудование: 1) ФЭК-Н-57 с оптической приставкой и микрокюветами; 2) плавающий компаратор; 3) мерные полуавтоматические пипетки или тарированные капельницы.

Построение калибровочной кривой. Из основного раствора казеина путем разбавления его буфером (5) готовят растворы казеина с концентрациями 0,2—2 *мг/мл*. В гнезда компаратора помещают 0,06 *мл* приготовленных растворов казеина и буфера (5) и по 0,04 *мл* 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Через 3 мин. измеряют мутность растворов на нефелометре ФЭК-Н-57 в микрокюветах, вставленных в специальные вкладыши.

Контрольную пробу готовят смешиванием 0,12 *мл* буфера и 0,04 *мл* 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. По разности оптических плотностей рабочих и контрольной проб находят оптическую плотность, соответствующую концентрации казеина в пробе. Калибровочную кривую строят, откладывая по оси ординат значения оптических плотностей, а по оси абсцисс соответствующую концентрацию казеина C_x, выраженную в миллиграммах в 1 *мл*.

Техника. 1. *Подготовка желудочного сока*. Пробы желудочного сока центрифугируют или фильтруют через марлю. Путем разбавления буфером (5) готовят разведения 1 : 10, 1 : 50, 1 : 100. Разведения удобно готовить в компараторе с подходящими по объему гнездами.

2. *Определение*: реакцию проводят в гнездах плавающего компаратора, помещенного в водяной термостат при 37°. Дозировку реактивов осуществляют при помощи мерных полуавтоматических или тарированных пипеток. В гнезда компаратора помещают по 0,06 *мл* рабочего раствора казеина и прогревают компаратор при 37° в термостате в течение 5—10 мин. Затем в рабочие гнезда компаратора вносят по 0,06 *мл* исследуемой жидкости. Контрольную пробу на фермент готовят добавлением к 0,06 *мл* исследуемой жидкости 0,06 *мл* буфера (5). Компаратор закрывают крышкой и инкубируют смеси при 37° в течение 15 мин. По окончании инкубации, для прекращения реакции и осаждения нерасщепленного казеина, к каждой пробе добавляют по 0,04 *мл* 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты и перемешивают. Мутность раствора измеряют против дистиллированной воды (фильтр № 10). По разности оптических плотностей рабочих и соответствующих контрольных проб [1] находят оптическую плотность E, определяющую концентрацию нерасщепленного казеина C_x. Превращение казеина не должно превышать 40%, так как только в этом случае наблюдается линейная зависимость между концентрацией фермента и скоростью реакции. При бо́льших процентах превращения могут получаться заниженные результаты.

При определении активности сначала ставят приближенный опыт с разведениями 1 : 10, 1 : 50, 1 : 100. В зависимости от значений оптической плотности в следующем точном определении разведения отдельных проб увеличивают или уменьшают.

Расчет активности. Активность выражают количеством миллиграммов казеина, расщепленного в минуту 1 *мл* желудочного сока. Рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{(C_0 - C_x) \cdot B}{T},$$

где A — активность в ед., C_0 — начальная концентрация казеина в миллиграммах в 1 *мл*; C_x — концентрация нерасщепленного казеина, находимая по калибровочной кривой; B — разведение исследуемой жидкости; T — время инкубации в минутах.

Определение протеолитической активности трипсина микроэкспресс-методом (КФ 3.4.4.4) [31]

Принцип. Метод основан на нефелометрическом определении количества казеина, не расщепленного трипсином при pH 8,0.

[1] Относительно построения калибровочной кривой см. стр. 459.

Реактивы: 1) 0,2н. раствор едкого натра; 2) 0,1н. раствор соляной кислоты; 3) 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты; 4) однозамещенный фосфат натрия; 5) двузамещенный фосфат натрия; 6) $^1/_{15}$ *М* фосфатный буфер pH 8,0: для приготовления 100 *мл* $^1/_{15}$ *М* фосфатного буфера pH 8,0 смешивают 5 *мл* $^1/_{15}$ *М* раствора однозамещенного фосфата натрия и 95 *мл* $^1/_{15}$ *М* раствора двузамещенного фосфата натрия. Буфер готовят на свеже прокипяченной дистиллированной воде и хранят в холодильнике при температуре 4°; 7) казеин очищенный: для приготовления 100 *мл* основного раствора 1 *г* казеина взбалтывают в 70 *мл* дистиллированной воды и при помешивании добавляют 10—12 *мл* 0,2н. раствора едкого натра (1) до растворения казеина. Затем осторожно по каплям прибавляют 10—12 *мл* 0,1н. — раствора соляной кислоты (2) до установления pH 7,0. При хранении в холодильнике основной раствор устойчив в течение месяца. Рабочий раствор готовят перед определением путем разведения основного раствора казеина в 10 раз $^1/_{15}$ *М* фосфатным буфером (6). Концентрация рабочего раствора казеина (C_0) равна 1 *мг/мл*.

Оборудование: 1) ФЭК-Н-57 с оптической приставкой и микрокюветами; 2) плавающий компаратор; 3) мерные полуавтоматические или тарированные пипетки.

Техника. Реакцию проводят при 37° в гнездах плавающего компаратора, помещенного в водяной термостат. Дозировку реактивов осуществляют при помощи мерных полуавтоматических или тарированных пипеток. В гнезда компаратора помещают по 0,06 *мл* рабочего раствора казеина и прогревают компаратор при 37° в термостате в течение 5—10 мин. Затем в рабочие гнезда компаратора вносят по 0,06 *мл* исследуемой жидкости. Контрольную пробу на фермент готовят добавлением к 0,06 *мл* исследуемой жидкости 0,06 *мл* фосфатного буфера. Компаратор закрывают крышкой и проводят инкубацию при 37° в течение 15 мин. По окончании инкубации, с целью прекращения реакции и осаждения нерасщепленного казеина, к каждой пробе добавляют по 0,04 *мл* 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты (3) и перемешивают. Мутность раствора измеряют против дистиллированной воды на нефелометре ФЭК-Н-57 в микрокюветах, вставляемых в специальные вкладыши (фильтр № 10). По разности оптических плотностей рабочих и соответствующих контрольных проб находят оптическую плотность E, определяющую концентрацию нерасщепленного казеина C_x. Процент превращения казеина должен быть не больше 40, так как только в этом случае наблюдается прямолинейная зависимость между концентрацией фермента и скоростью реакции. В противном случае могут получаться заниженные результаты.

Построение клибровочной кривой. Из основного раствора казеина готовят путем разбавления фосфатным буфером (6) растворы казеина с концентрациями 0,2—2 *мг/мл*. В гнезда компаратора помещают по 0,06 *мл* приготовленных растворов казеина и буфера и по 0,04 *мл* 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты (3). Через

3 мин. измеряют мутность растворов на нефелометре против дистиллированной воды. Контрольную пробу готовят смешиванием 0,12 *мл* буфера и 0,04 *мл* трихлоруксусной кислоты. По разности оптических плотностей рабочих и контрольной проб находят плотность, соответствующую концентрации казеина в пробе. Калибровочную кривую строят, откладывая по оси ординат значение оптических плотностей, а по оси абсцисс соответствующую концентрацию казеина C в миллиграммах в 1 *мл*.

Расчет активности. Активность выражают количеством миллиграммов казеина, расщепленного в минуту 1 *мл* исследуемой жидкости.

$$A = \frac{(C_0 - C_x) \cdot B}{T},$$

где A — активность фермента до ед., C_0 — начальная концентрация казеина в миллиграммах в 1 *мл*, C_x — концентрация нерасщепленного казеина, находимая по калибровочной кривой, B — разведение исследуемой жидкости, T — время инкубации, мин.

Определение глютамикоаспарагиновой и глютамикоаланиновой аминофераз (трансаминаз) [3]

П р и н ц и п. В результате переаминирования, происходящего под действием аминофераз, образуется щевелевоуксусная кислота, которая действием анилинцитрата превращается в пировиноградную кислоту [1]. При добавлении кислого 2,4-динитрофенилгидразина энзиматический процесс останавливается и образуется гидразон. Последний с едким натром дает окрашивание от желтого до фиолетово-красного цвета, интенсивность которого пропорциональна количеству образовавшейся пировиноградной кислоты.

Р е а к т и в ы: 1) $M/15$ раствор двузамещенного фосфорнокислого натрия: растворяют 11,86 *г* $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ в воде и доводят объем до 1 *л* (соль предварительно растирают в ступке и двое суток выветривают на воздухе); 2) $M/15$ раствор фосфорнокислого калия: растворяют 9,1 *г* KH_2PO_4 в воде и по растворении доводят объем до 1 *л*; 3) $M/15$ фосфатный буфер с pH 7,5: смешивают 840 *мл* $M/15$ раствора фосфорнокислого калия. Добавляют 5—10 *мл* хлороформа и энергично встряхивают. Хранят 4—5 месяцев. С фенолрот дает мясо-красную окраску; 4) субстратная смесь для определения глютамикоаспарагиновой аминоферазы (смесь А): 1,33 *г* DL-аспарагиновой кислоты или 0,665 *г* L-аспарагиновой кислоты и 0,073 *г* α-кетоглютаровой кислоты вносят в мерную колбу емкостью 50 *мл*

---

[1] Необходимость добавления анилинцитрата отпадает при определении глутамикоаланиновой аминоферазы, поскольку пировиноградная кислота в этом случае образуется непосредственно в результате реакции переаминирования между L-аланином и α-кетоглутаровой кислотой.

и растворяют в 4,4 *мл* 10%-ного раствора едкого натра. Затем до метки доводят *M*/15 раствором фосфатного буфера с pH 7,5; 5) субстратная смесь для определения глютамико-аланиновой аминоферазы (смесь Б): 0,89 *г* *DL*-аланина или 0,445 *г* α-аланина и 0,073 *г* α-кетоглютаровой кислоты вносят в мерную колбу емкостью 50 *мл*, добавляют 0,4 *мл* 10%-ного раствора едкого натра, затем доводят до метки *M*/15 раствором фосфатного буфера с pH 7,5. Хранят до 2 недель; 6) 50%-ный раствор трихлоруксусной кислоты: 20 *г* уксусной кислоты растворяют в 20 *мл* дистиллированной воды; 7) раствор анилинцитрата; 5 *г* лимонной кислоты растворяют в 5 *мл* воды, добавляют 5 *мл* анилина (свежеперегнанного), хорошо перемешивают. Сохраняют до 2 месяцев в темной склянке в холодильнике; 8) раствор 2,4-динитрофенилгидразина: 50 *мг* 2,4-динитрофенилгидразина растворяют в колбе емкостью 50 *мл* в 10 *мл* концентрированной соляной кислоты при слабом нагревании на водяной бане. После охлаждения доводят до метки водой. Хранят в темной склянке. Годен в течение месяца; 9) насыщенный водой толуол: 500 *мл* толуола тщательно встряхивают в делительной воронке с 15—20 *мл* воды. После разделения слоев воду отделяют; 10) 2,5%-ный спиртовый раствор едкого кали: 12,5 *г* едкого кали растворяют в 500 *мл* этилового спирта. Раствор предохраняют от углекислоты воздуха, соединив сосуд с трубкой, содержащей натронную известь. При появлении мути раствор фильтруют через сухой фильтр или добавляют несколько капель воды; 11) 10%-ный раствор едкого натра; 12) стандартный раствор пирувата натрия для приготовления калибровочной кривой: растворяют 200 *мг* пировинограднокислого натрия в 100 *мл* воды. Перед употреблением этот раствор разбавляют в 4 раза дистиллированной водой и получают рабочий раствор, 1 *мл* которого содержит 50 *мкг* пирувата натрия.

Для приготовления калибровочной кривой в пробирки наливают 0,2; 0,6; 0,8 и 1 *мл* рабочего стандартного раствора, что соответствует 10, 20, 30, 40 и 50 *мкг* пирувата натрия. В каждую пробирку, кроме последней, добавляют дистиллированной воды до 1 *мл*. Затем во все пробирки прибавляют по 0,5 *мл* раствора 2,4-динитрофенилгидразина, перемешивают и через 5 мин. добавляют по 0,5 *мл* водного толуола. Содержимое пробирок встряхивают в течение полминуты. Отбирают 1,5 *мл* толуолового (верхнего) слоя и переносят в чистую пробирку, куда добавляют 4,5 *мл* 2,5%-ного спиртового раствора едкого кали, тщательно перемешивают и оставляют на 10 мин. при комнатной температуре. Интенсивность красно-оранжевой окраски определяют через 10 мин. на ФЭК с синим фильтром в кюветах с толщиной слоя жидкости 10 *мм* против контроля на реактивы. Контролем на реактивы служит 1 *мл* воды, обработанной аналогичным образом. Берут 0,5 *мл* воды и ставят две контрольные пробы. Перед колориметрированием их смешивают. Интенсивность окрасти контроля не должна превышать 0,05—0,06 показаний ФЭК против воды. Если величина оптической плотности больше, то проверяют количество 2,4-динитрофенилгидразина или анилинцитрата.

Техника. *Определение глютамикоаспарагиновой аминоферазы*. В центрифужную пробирку емкостью 10 *мл* вносят 0,5 *мл* субстратной смеси (4), содержащей 50 *мкмолей* *L*-аспарагиновой и 5 *мкмолей* α-кетоглютаровой кислот. Субстратную смесь выдерживают в водяной бане при 25° в течение 4—5 мин. Затем добавляют 0,5 *мл* сыворотки крови и инкубируют пробу в водяной бане при 25° 20 мин. По окончании инкубации добавляют 1 каплю 50%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Содержимое пробирки перемешивают и добавляют 2 капли раствора анилинцитрата, хорошо перемешивают и оставляют на 20 мин. при комнатной температуре. Через 20 мин. в каждую пробирку добавляют 0,5 *мл* раствора 2,4-динитрофенилгидразина, перемешивают, добавляют 2,5 *мл* водного толуола и энергично встряхивают 5 мин. при 2000—2500 *об/мин*. Осторожно отбирают 1,5 *мл* толуолового слоя и переносят в чистую пробирку. Добавляют 4,5 *мл* 2,5%-ной спиртовой щелочи и через 10 мин. колориметрируют на ФЭК-М, как указано при построении калибровочной кривой.

Определение глютамикоаланиновой аминоферазы. В центрифужную пробирку вносят 0,5 *мл* смеси Б и выдерживают в водяной бане при 25° 4—5 мин. Затем добавляют 0,5 *мл* сыворотки и инкубируют в водяной бане 10 мин. при той же температуре. Затем добавляют 1 каплю 50%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Тщательно перемешивают, добавляют 0,5 *мл* раствора 2,4-динитрофенилгидразина, вновь тщательно перемешивают, оставляют на 5 мин. при комнатной температуре. Затем добавляют по 2,5 *мл* водного толуола, закрывают пробкой, встряхивают полминуты и центрифугируют 5 мин. при 2500 *об/мин*. Далее определение проводят как указано при построении калибровочной кривой.

Кроме контроля на реактивы, делают контроль на сыворотку, чтобы знать количество пировиноградной кислоты в крови. Для этого к 0,5 *мл* сыворотки добавляют 1 каплю 50%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, хорошо перемешивают и оставляют на несколько минут при комнатной температуре для свертывания белка. Затем добавляют 0,5 *мл* субстратной смеси и дальше поступают как указано выше.

Расчет. Ферментативную активность сыворотки выражают числом условных единиц в 1 *мл*. За единицу принимают такое количество фермента, которое образует в указанных выше условиях 1 *мкг* пировиноградной кислоты.

Расчет ферментативной активности сыворотки производят по калибровочному графику, при построении которого на оси ординат откладывают показания ФЭК, а на оси абсцисс — микрограммы пировиноградной кислоты, которые составляют $^4/_5$ от количества микрограммов взятого пирувата натрия. Величину, найденную по графику, умножают на 2. Полученная величина (в *мкг*) соответствует числу единиц фермента в 1 *мл* сыворотки. При соблюдении всех условий опыта точность метода может быть доведена до 3—5%. Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

Микрометод определения активности глютамико-аланиновой и глютамико-аспарагиновой трансаминаз в сыворотке крови [32]

(глютамико-аланиновая — аланин-аминотрансфераза, КФ 2.6.1.2; глютамико-аспарагиновая—аспартат-аминотрансфераза, КФ 2.6.1.1)

Принцип. В основу метода положено определение суммарной экстинкции динитрофенилгидразонов пировиноградной кислоты, являющейся продуктом реакции, и α-кетоглютаровой кислоты, служащей исходным веществом при реакции переаминирования [33]. Значительное различие в оптической плотности этих двух гидразонов уже было использовано в ряде методик определения трансаминазной активности, позволяющих исключить процедуру экстракции реакционной смеси органическими растворителями.

Пировиноградная кислота является непосредственным продуктом реакции, протекающей при действии глютамико-аланиновой трансаминазы. При определении активности глютамико-аспарагиновой трансаминазы образующаяся щавелево-уксусная кислота предварительно переводится в пировиноградную кислоту при помощи анилин-цитрата.

Расчет активности обоих ферментов проводится на основании сравнения экстинкций, найденных в исследуемых и контрольных пробах, с калибровочными кривыми.

Реакции проводятся в гнездах плавающего компаратора. Реактивы дозируются либо микроавтоматическими пипетками с мерными капиллярами, либо тарированными капельницами.

Фотометрирование осуществляется при помощи микрокювет и оптических приставок на электрофотоколориметре типа ФЭК-Н-57.

Метод позволяет ограничиваться получением крови при уколе пальца и проводить серийные исследования многочисленных проб.

Реактивы: 1) субстрат для определения глютамико-аспарагиновой трансаминазы (субстрат № 1) : 3 *мг* α-кетоглютаровой кислоты и 226 *мг* *DL*-аспарагиновой кислоты растворяют в небольшом количестве 0,75 н. NaOH (5). Доводят этой же щелочью до pH 7,4 (по индикаторной бумаге), затем добавляют фосфатный буфер pH 7,4 (3) до 20 *мл*; 2) субстрат для определения глютамико-аланиновой трансаминазы (субстрат № 2): 3 *мг* α-кетоглютаровой кислоты и 178 *мг* *DL*-аланина растворяют в небольшом количестве фосфатного буфера pH 7,4 и доводят этим же буфером до 20 *мл*. Полученные растворы субстратов содержат в 1 *мл* 1 *мкмоль* α-кетоглютаровой кислоты и 100 *мкмолей* аспарагиновой кислоты или аланина. Эти растворы следует сохранять в замороженном состоянии; срок годности 7—10 дней. Перед работой оттаивать полностью и перемешать; 3) фосфатный буфер pH 7,4: для приготовления 500 *мл* раствора берут 7,52 *г* $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ и 1,096 *г* KH_2PO_4; 4) раствор анилин-цитрата: 5 *г* перекристаллизованной лимонной кислоты растворяют в 5 *мл* дистиллированной воды и добавляют 5 *мл* свежеперегнанного анилина. Перед употреблением разводят в 5 раз водой; 5) 0,75 н. раствор NaOH; 6) 0,1%-ный раствор динитро-

фенилгидразина (ДНФГ): 50 *мг* 2,4-динитрофенилгидразина растворяют в 10 *мл* концентрированной кислоты при слабом нагревании на водяной бане и доводят водой до 50 *мл*.

Оборудование: 1) микроавтоматические пипетки с мерными капиллярами или тарированные капельницы; 2) плавающий компаратор; 3) водяной термостат для него; 4) ФЭК-Н-57 с оптической приставкой и микрокюветами.

Техника (глютамико-аспарагиновая трансаминаза — см. стр. 465). *Опыт*. В гнезда плавающего компаратора вносят по 0,04 *мл* (2 капли) исследуемой сыворотки, предварительно разведенной в 4 раза фосфатным буфером (3), закрывают крышкой и помещают в водяной термостат при 37° на 10 мин. Затем к сыворотке добавляют 0,02 *мл* (1 капля) субстрата № 1, перемешивают тонкой стеклянной палочкой и инкубируют в закрытом компараторе при 37° в течение 30 мин. После инкубации добавляют 0,02 *мл* (1 капля) фосфатного буфера (3), затем для инактивации и ускорения декарбоксилирования щавелево-уксусной кислоты вливают 0,02 *мл* (1 капля) разведенного в 5 раз раствора анилин-цитрата (4), перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 20 мин. После этого вносят 0,02 *мл* (1 капля) 0,1%-ного 2,4-ДНФГ (6), тщательно перемешивают и через 5 мин. добавляют 0,14 *мл* (7 капель) 0,75 н. раствора NaOH, снова перемешивают и развившуюся окраску колориметрируют через 10 мин. на ФЭК при помощи микрокювет и оптических приставок с фильтром № 5 (536 *ммк*).

Контроль. Параллельно с исследуемыми пробами ставят контрольные. Для этого в гнезда компаратора вносят по 0,04 *мл* (2 капли) исследуемой сыворотки и 0,02 *мл* (1 капля) фосфатного буфера pH 7,4 (3) инкубируют вместе с опытными пробами в течение 30 мин. при 37° в водном термостате. После инкубации вносят 0,02 *мл* (1 капля) разведенного в 5 раз раствора анилин-цитрата (4), тщательно перемешивают тонкой стеклянной палочкой и оставляют при комнатной температуре на 20 мин. Затем в гнезда с контрольными пробами добавляют те же реактивы, что и в исследуемые пробы, т. е. 0,02 *мл* (1 капля) 0,1%-ного раствора 2,4-динитрофенилгидразина (6) и через 5 мин. 0,14 *мл* (7 капель) 0,75 н. раствора NaOH, перемешивают и колориметрируют при соблюдении сказанных выше условий.

Техника (глютамико-аланиновая трансаминаза — см. стр. 466). *Опыт*. В гнезда плавающего компаратора вносят по 0,04 *мл* (2 капли) сыворотки, предварительно разведенной в 4 раза фосфатным буфером (3), закрывают крышкой и помещают в водный термостат при 37° на 10 мин. Затем к сыворотке добавляют 0,02 *мл* (1 капля) субстрата № 2 для определения активности глютамико-аланиновой трансаминазы, перемешивают стеклянной палочкой и инкубируют в течение 30 мин. После инкубации к пробам добавляют 0,04 *мл* (2 капли) фосфатного буфера (3) и 0,02 *мл* (1 капля) 2,4-ДНФГ (6). Последний является не только реактивом на пировиноградную кислоту, но используется и в качестве инактивирующего

агента. Пробы перемешивают и через 5 мин. после добавления ДНФГ вносят 0,14 *мл* (7 капель) 0,75 н. NaOH. Снова тщательно перемешивают и через 10 мин. колориметрируют растворы образовавшихся гидразонов на фотоэлектроколориметре типа ФЭК-Н-57 при помощи оптических приставок и микрокювет со светофильтром № 5.

Контроль. В гнезда компаратора вносят по 0,04 *мл* (2 капли) сыворотки, прогревают в водном термостате в течение 10 *мин.* при 37°. Затем добавляют 0,04 *мл* (2 капли) буфера (3), перемешивают, закрывают компаратор крышкой и инкубируют в течение 30 мин. После инкубации к пробам добавляют по 0,02 *мл* субстрата № 2 и тотчас после внесения субстрата реакцию останавливают прибавлением 0,02 *мл* 0,1%-ного раствора 2,4-ДНФГ (6). Перемешивают и через 3 мин. добавляют 0,14 *мл* 0,75 н. NaOH. Снова тщательно перемешивают содержимое и через 10 мин. колориметрируют растворы, как указано выше.

Вычисление активности трансаминаз в сыворотке. Активность трансаминаз выражают числом единиц в 1 *мл* сыворотки крови. За одну единицу трансаминазной активности принимают такое количество фермента, которое образует 1 *мкг* пировиноградной кислоты в данных условиях. Для вычисления содержания пировиноградной кислоты из значения экстинкции исследуемой пробы вычитают значение экстинкции контрольной пробы:

$$E_{ф} = E_{оп} - E_{к}.$$

Найденное значение экстинкции, соответствующее количеству образовавшейся пировиноградной кислоты (в виде динитрофенилгидразона), является отображением трансаминазной активности. Затем по стандартной кривой (см. ниже), отражающей зависимость величины экстинкции от количества пировиноградной кислоты в пробе (в *мкг*), находят, какому содержанию пировиноградной кислоты соответствует данное значение экстинкции. Найденную величину умножают на разведение сыворотки. Расчет ведут по формуле

$$A = a \cdot Б,$$

где A — активность трансаминаз в 1 *мл* сыворотки в условных единицах, a — количество *мкг* пировиноградной кислоты, найденное по калибровочной кривой, $Б$ — разведение сыворотки.

Содержание глютамико-аспарагиновой и глютамико-аланиновой трансаминаз в норме колеблется от 26 до 96 и от 15 до 98 единиц, соответственно при инкубации в течение 60 мин. при 37°.

Построение калибровочной кривой. Растворяют 10 *мг* пирувата натрия в 50 *мл* дистиллированной воды. Полученный раствор перед определением разводят в 4 раза водой из расчета содержания в 1 *мл* рабочего раствора 50 *мкг* пирувата натрия или 40 *мг* пировиноградной кислоты. Готовят серию разведений, для чего в пробирки наливают 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 *мл* стандартного раствора и добавляют

воду до 1 *мл*. Полученные растворы содержат 10, 20, 30, 40 *мкг* пировиноградной кислоты в 1 *мл*. Затем в гнезда плавающего компаратора вносят 0,04 *мл* (2 капли) стандартного раствора каждой концентрации, 0,04 *мл* фосфатного буфера и 0,02 *мл* (1 капля) 2,4-ДНФГ (6). Перемешивают и через 5 мин. добавляют 0,4 *мл* 0,75 н. NaOH. Колориметрируют растворы на фотоэлектроколориметре типа ФЭК-Н-57 при помощи микрокювет и оптических приставок. Затем строят калибровочную кривую, откладывая на оси ординат значения экстинкции каждой пробы (за вычетом контроля на реактивы), а на оси абсцисс соответствующее им содержание пировиноградной кислоты [33].

Микроэкспресс-метод определения активности алиэстеразы в крови [34]

(Карбоксилэстераза; КФ 3.1.1.1)

П р и н ц и п. определения активности данного фермента состоит в установлении времени, необходимого для расщепления 1,5 *мкмоля* трибутирина.

Время реакции определяется по скорости изменения цвета индикатора в стандартном буферном растворе вследствие освобождения кислоты при гидролизе трибутирина.

Колориметрическое сравнение проводится при помощи стандартного раствора, цвет которого соответствует конечной окраске реакционной смеси. В качестве индикатора используется сравнительно концентрированный раствор бромтимолового синего.

Активность алиэстеразы выражается количеством микромолей трибутирина, расщепленного 1 *мл* крови за 1 мин.

Р е а к т и в ы: 1) основной индикаторно-буферный раствор: 200 *мг* индикатора бромтимолового синего растирают в ступке с 4 *мл* 0,1 н. раствора едкого натра. Синий раствор переносят в мерную колбу емкостью 200 *мл*, ступка споласкивается несколько раз небольшими количествами воды, свободной от CO_2, которая также переливается в мерную колбу. Сюда же прибавляется 16 *мл* 0,1 н. раствора едкого натра и 50 *мл* 0,1 *М* раствора борной кислоты (в 1 *М* растворе хлористого калия), содержимое колбы доводят до метки дистиллированной водой (без CO_2). Полученный раствор синего цвета, pH 8,65—8,7. При хранении стоек; 2) индикаторно-буферный раствор для приготовления колориметрического стандарта № 2 : 0,5 *мл* раствора 1 смешивают с 0,2% раствора гликохолевокислого натрия (водного), сюда же добавляют 2 *мл* 0,02 н. раствора соляной кислоты. Раствор имеет зеленую окраску. Готовится перед употреблением; 3) индикаторно-буферный раствор трибутирина: 1 каплю трибутирина (примерно 12 *мг*) смешивают с 10 *мл* 0,2%-ного водного раствора гликохолевокислого натрия, смесь встряхивают в течение часа в аппарате для встряхивания. Раствор годен в течение 2—3 дней при хранении в холодильнике. Перед употреблением 2 *мл*

полученного раствора смешивают с 0,5 *мл* раствора 1, цвет раствора синий.

Оборудование: 1) плавающий компаратор и водяной термостат; 2) микроавтоматические пипетки с мерными капиллярами или тарированные капельницы.

Т е х н и к а. По 0,04 *мл* (2 капли) раствора плазмы или сыворотки крови (разведение крови в 10 раз) помещают в два гнезда плавающего компаратора. Компаратор закрывают крышкой и помещают в водяной термостат (38°). После 10—15 мин. нагревания в одно гнездо (левое), служащее вторым колориметрическим стандартом, добавляют 0,04 *мл* (2 капли) раствора 2 — цвет салатный; во второе гнездо, служащее опытной пробой, добавляют 0,04 *мл* раствора 3 — цвет синий.

Содержимое гнезд перемешивают и отмечают время начала реакции. Концом реакции считают время, за которое происходит уравнивание цвета опытной пробы со вторым стандартом.

Расчет по формуле:

$$A_{ал} = \frac{1{,}5 \cdot v}{T},$$

где $A_{ал}$ — активность алиэстеразы, выраженная в микромолях трибутирина, разложенного 1 *мл* крови за 1 мин., v — разведение крови, T — время реакции в минутах, 1,5 — количество микромолей кислоты, введенное в стандарт № 2.

Для взрослых, практически здоровых людей величина активности алиэстеразы в крови колеблется в пределах от 0,90 до 1,88 (в среднем 1,39) *мкмоля* субстрата/на 1 *мл* крови в минуту.

Микрометод определения активности уриказы

(Уратоксидаза; КФ 1.7.3.3) [35]

Принцип основан на измерении падения оптической плотности мочевой кислоты (E_{293}), превращаемой уриказой в аллантоин.

$$\text{мочевая кислота}\; C{=}O + O_2 + 2H_2O \rightleftarrows H_2N\text{–}C(O)\text{–}NH\text{–}C\ldots C{=}O + CO_2 + H_2O_2$$

Р е а к т и в ы: 1) 0,5 M глицилглициновый буфер, pH 8,0; 2) основной раствор мочевой кислоты; 1 *ммоль* в 0,01 н. NaOH; 3) субстратно-буферная смесь мочевой кислоты (0,1 *ммоля*). Готовится непосредственно перед определением путем разведения основного раствора в 10 раз глицилглициновым буфером; 4) 0,5 н. раствор $HClO_4$.

Техника. В три микропробирки полуавтоматическими или капельными микропипетками вносят по 180 *мкл* субстратно-буферной смеси и 40 *мкл* исследуемого материала. Реакционную смесь тщательно перемешивают и инкубируют при 37° в течение 30 мин. По истечении времени инкубации добавляют по 160 *мкл* 0,5 н. раствора $HClO_4$ и выдерживают 15 мин. при 0—4°.

Одновременно ставят контрольные пробы (с каждым образцом исследуемого материала). Для этого в микропробирки вносят по 160 *мкл* 0,5 н. раствора $HClO_4$, 180 *мкл* субстратно-буферной смеси и 40 *мкл* исследуемого материала и помещают в ледяную баню (0—4°) на 30 мин.

Опытные и контрольные пробы центрифугируют при 4000 *об/мин*. 10 мин. Оптическую плотность надосадочной жидкости замеряют в кварцевой микрокювете спектрофотометра (E_{293}). Активность выражают как ΔE_{293} на 1 *г* ткани в 1 мин.

Принцип расчета. $A = \Delta E/мин \times B$, где A — активность фермента, B — разведение исследуемого материала. $\Delta E = \Delta E_{к} - \Delta E_{оп}$ — разность изменения экстинкции контрольного и опытного растворов. Таким образом, $\Delta E/мин$ — средняя скорость изменения экстинкции за счет ферментативной реакции. Активность уриказы целесообразно выражать в мкмолях мочевой кислоты, разложенной за минуту ферментом, содержащимся в грамме ткани. По стандартной кривой, отражающей экстинкцию мочевой кислоты при 2930 Å, или по молярно-экстинкционному коэффициенту легко рассчитать количество превращенного субстрата.

Определение активности β-галактозидазы [36]
(КФ 3.2.1.23)

β-Галактозидаза — фермент, расщепляющий лактозу на галактозу и глюкозу; он широко распространен в организме млекопитающих (наибольшая активность его обнаружена в слизистой кишечника и в печени). Изучение активности данного фермента имеет особое диагностическое значение в целях выявления так называемой врожденной непереносимости лактозы — достаточно часто встречающегося наследственного заболевания.

Принцип основан на спектрофотометрическом (или колориметрическом) определении *о*-нитрофенола, освобожденного в результате реакции

$$о\text{-нитрофенил-}\beta\text{-}D\text{-галактопиранозид} - NO_2 + HOH \xrightleftharpoons{\beta\text{-галактозидаза}} \beta\text{-галактоза} +$$

H₂COH, O, OH, OH, H, H, OH
о-нитрофенил-β-*D*-галактопиранозид

H₂COH, O, OH, OH, OH, H, H, H, H, OH
β-галактоза

OH

$+$ (бензольное кольцо) $-NO_2$

о-нитрофенол

Реактивы: 1) 0,2 *M* Na_2HPO_4 — 0,1 *M* цитратный буфер pH 3,6 (для печени) или pH 4,80 (для слизистой тонкого кишечника); 2) 5 *мM* раствор *о*-нитрофенил-β-*D*-галактопиранозида на 0,2 *M* $NaHPO_4$ — 0,1 *M* цитратном буфере pH 3,6 (pH 4,8); 3) 0,4 *M* глицин — NaOH буфер pH 10,8; 4) 2 *M* (основной) раствор *о*-нитрофенола (для построения стандартной кривой).

Техника. *Опыт*: в три микропробирки вносят по 40 *мкл* исследуемого раствора, содержащего 2 *мг* ткани (печень) или 4 *мг* (слизистая кишечника), и по 40 *мкл* буфера pH 3,6 (4,8) прогревают в течение 5 мин. в водяной бане при 37° и добавляют 40 *мкл* предварительно прогретого до той же температуры раствора субстрата (*о*-нитрофенил-β-*D*-галактопиранозид). Содержимое пробирок тщательно перемешивают и инкубируют в течение 30 мин. при 37°.

Контрольные пробы на оптическую плотность исследуемого материала и раствора субстрата ставятся так же, как и опытные, но в первом случае вместо исследуемого материала вносят 40 *мкл* суспензирующей среды (сахароза, физиологический раствор и т. п.), а во втором вместо раствора субстрата добавляется 40 *мкл* Na_2HPO_4-цитратного буфера pH 3,6 (4,8) (контроль на оптическую плотность раствора субстрата ставится один на серию определений).

После инкубации опытные и контрольные пробы переносятся на ледяную баню и в каждую пробирку вносят по 160 *мкл* NaOH-глицинового буфера pH 10,8. Содержимое пробирок перемешивают и через 15 мин. центрифугируют при 1500 *g* в течение 10 мин.

Оптическую плотность надосадочной жидкости измеряют в микрокювете спектрофотометра (или колориметра) при 420 *ммк*.

Активность фермента выражают в *мкмолях* *о*-нитрофенола, освобожденного в минуту граммом ткани (или белка).

Расчет активности производят по формуле

$$A = \frac{\Delta E \cdot 1000}{E_c \cdot T \cdot P},$$

где A — активность фермента в *мкмоль/мин/г* ткани; ΔE — разность между экстинкцией опытной и контрольных проб; E_c — экстинкция стандартного раствора, содержащего 1 *мкмоль* *о*-нитрофенола в пробе (находят по стандартной кривой путем экстраполяции); T — время инкубации ферментной реакции (в мин.); P — количество миллиграммов ткани в пробе; 1000 — коэффициент пересчета на 1 *г* ткани (1 *г* = 1000 *мг*).

ЛИТЕРАТУРА

1. Персональное сообщение А. А. Покровского и В. А. Тутельяна.
2. Персональное сообщение А. А. Покровского, А. Н. Арчакова, А. М. Герасимова.
3. Персональное сообщение А. А. Покровского, А.Н. Арчакова и А. М.Герасимова.
4. Персональное сообщение А. А.Покровского, А. Н.Арчакова и А. М. Герасимова.
5. Персональное сообщение А. А. Покровского, А. Н. Арчакова и О. Н. Любимцевой.
6. Персональное сообщение А. А. Покровского, А. Н. Арчакова и О. Н. Любимцевой.
7. Персональное сообщение А. А. Покровского, А. Н. Арчакова, О. Н. Любимцевой.
8. Персональное сообщение А. А. Покровского, А.Н. Арчакова и Л. Г. Пономаревой.
9. Персональное сообщение А. А. Покровского и А. Н. Арчакова.
10. Персональное сообщение А. А. Покровского, А. Н. Арчакова, Л. Н. Болтуновой и И. И. Мусина.
11. Персональное сообщение А. А. Покровского и К. А. Коровникова.
12. *Smithies O.* J. Biochem., 1958, **68**, 500.
13. *Smithies O.* Adv. Protein Chem., 1959, **14**, 65.
14. *Smithies O.* J. Biochem., 1955, **61**, 629.
15. Smithies O. Nature, 1957, **180**, 1482.
16. Персональное сообщение А. А. Покровского, Э. А. Малаховой и Л. Д. Болтуновой.
17. *Nachlas M. M.* J. Nat. Cancer Inst., 1949, **9**, 415.
18. *Gomori G.* Microscopic Histochemistry. Principles and Practice. Univ. Chicago Press, Chicago, 1952, 211.
19. Персональное сообщение А. А. Покровского и К. А. Коровникова.
20. *Покровский А. А.* В кн. «Химические основы процессов жизнедеятельности». М., 1962, 311.
21. *Dole V.* J. Clin. Invest., 1956, **35**, 150.
22. *Gordon R.* a. *Cherkes A.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1958, **97**, 150.
23. Персональное сообщение А. А. Покровского и К. А. Коровникова.
24. Персональное сообщение А. А. Покровского, М. Б. Шейкмана и Р. А. Пиленицыной.
25. Персональное сообщение А. А. Покровского, см. также: *Покровский А. А.* В кн. «Химические основы процессов жизнедеятельности»., М.,1962, стр. 311.
26. Персональное сообщение А. А. Покровского, Л. Г. Пономаревой, А. И. Щербаковой.
27. Персональное сообщение А. А. Покровского и А. И. Щербаковой.
28. Персональное сообщение А. А. Покровского и А. И. Щербаковой.
29. *Покровский А. А.* В кн. «Современные методы биохимии». М., «Медицина», 1968, стр. 49.
30. Персональное сообщение А. А. Покровского и Л. М. Сергеевой, см. также *Предтеченский В. Е.*, *Боровская В. М.*, *Марголина Л. Т.* Лабор. методы исслед. М., 1956, 492.
31. Персональное сообщение А. А. Покровского и Л. М. Сергеевой.
32. Персональное сообщение А. А. Покровского, Л. В. Павлихиной, Ю. Г. Клюковского.
33. *Пасхина Т. С.* Методическое письмо института биологической и медицинской химии. Изд-во АМН СССР, 1959.
34. Персональное сообщение А. А. Покровского и Л. Г. Пономаревой.
35. Персональное сообщение А. А. Покровского и М. М.-Г. Гаппарова.
36. Персональное сообщение А. А. Покровского, Л. Г. Пономаревой и В. А. Тутельяна.
37. *Покровский А. А.* В кн. «Актуальные вопросы современной биохимии». М., Медгиз, 1962, 243.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛИПАЗ, ЭСТЕРАЗ И ФОСФАТАЗ

(Липаза КФ 3.1.1.3; эстеразы КФ 3.1.1.2, 3.1.1.1; фосфатазы: кислая КФ 3.1.3.2; щелочная — КФ 3.1.3.1)

Общие замечания к методике определения эстераз, липаз и фосфатаз в биологических жидкостях

Эстеразы

Эстеразы — ферменты, расщепляющие различные сложные эфиры. Их можно разделить на две большие группы, хотя эту классификацию нельзя признать вполне удовлетворительной: алиэстеразы, для которых субстратами являются все эфиры не содержащих азота спиртов, и холинэстеразы, субстратом которых является только холин (прокаинэстеразы относятся, видимо, к группе холинэстераз).

Алиэстеразы в свою очередь делятся на две подгруппы: а) липазы, которые довольно эффективно расщепляют почти все субстраты для алиэстераз данной группы, включая и эфиры жирных кислот с длинной цепью, и б) собственно эстеразы, которые быстро расщепляют эфиры с короткими цепями и лишь очень слабо действуют на длинноцепочечные эфиры; липазы активируются, собственно эстеразы тормозятся таурохолатом.

Холинэстеразы также делятся на: а) истинные, или специфические, холинэстеразы, которые расщепляют ацетилхолин значительно сильнее, чем другие эфиры холина, б) «псевдо»-, или неспецифические, холинэстеразы, которые почти одинаково действуют на ряд холиновых эфиров.

Это разграничение нечетко ввиду частого перекрывания специфичности действия субстратов и эффекта угнетения. К тому же весьма заметны специфические особенности различных эстераз одного и того же органа. Наиболее четким различием между двумя основными группами является отношение к эзерину; холинэстеразы почти в 1000 раз чувствительнее к эзерину, нежели алиэстеразы.

Эстеразы крови изучались больше 50 лет в основном сталагмометрическими, титрометрическими, нефелометрическими, газометрическими и электрометрическими методами.

Применяемая ныне для определения эстераз фотометрическая техника первоначально была предложена для четырех типов ферментов с соответствующими субстратами: 1) простые эстеразы (суб-

страты — этил-бутират, салицилаты и подобные эфиры); 2) холинэстеразы (субстраты — ацетил- и бензоилхолин); 3) прокаинэстеразы (субстрат-прокаин); 4) липазы (субстраты — оливковое масло, трибутирин, эфиры нафтола и жирных кислот с длинной цепью), часто в присутствии таурохолата.

Как указывалось выше, установлена идентичность прокаин-эстеразы и псевдохолинэстеразы. Имеются данные, указывающие, что расщепление большинства эфиров с длинными цепями в нормальной сыворотке человека на 95% обусловлено псевдохолинэстеразой. Основываясь на строгой взаимозависимости между гидролизом холина и нехолиновых эфиров, некоторые авторы предложили методы определения холинэстеразы при помощи нехолинового эфира. При этом значение сохраняется лишь за двумя эстеразами сыворотки— псевдохолинэстеразой и липазой.

Следует заметить, что фермент эритроцитов представляет собой истинную холинэстеразу. Для определения активности при подозрениях на отравление антихолинэстеразными лекарствами в качестве субстрата следует применять только ацетилхолин. Данные относительно остальных субстратов неполные. Обойтись без несколько громоздкого манометрического или электрометрического метода не удается.

В большинстве методов определения холинэстераз в качестве субстрата используется ацетилхолин, который после гидролиза дает холин и уксусную кислоту. Образовавшуюся кислоту определяют одним из следующих методов:

1. Титрование [19, 20].
2. Измерение времени, нужного для изменения окраски pH-индикатора [21].
3. Фотометрическое измерение изменения pH с феноловым красным или бромтимоловым синим в качестве индикатора [32].
4. Измерение изменения pH на pH-метре [32].
5. Нефелометрическое определение влияния уксусной кислоты на молоко [32].
6. Манометрическое определение CO_2, освобожденного из бикарбонатного буфера [32].

Один из методов, в котором в качестве субстрата использован ацетилхолин, основан на фотометрическом измерении потребленного ацетилхолина [22]. Гидроксиламин реагирует с ацетилхолином с образованием ацетилгидроксамовой кислоты, которая с ионами железа в кислой среде образует темно-фиолетовый комплекс.

Из других субстратов, используемых в разных методах, можно назвать следующие: индофенил-ацетат, дающий после гидролиза окрашенный продукт [23]; бензоилхолин, расщепление которого вызывает изменения поглощения в ультрафиолете [24]; эфир тиохолин-хлорида, о степени гидролиза которого судят по понижению поглощения при 229 *ммк* фотометрическим нитропрусидным измерением тиоловых групп в продукте реакции [25] или фотометри-

ческим измерением окраски индофенола, восстановленного освобожденным тиохолином [26]; фенилбензоат, определяя высвобожденный фенолдиазореактивом или же реактивом Фолина и Чиокалтеу [27]; бутирилхолин, гидролиз которого вызывает изменения pH, что и измеряется; *о*-нитрофенилбутират; интенсивность окраски освобожденного *о*-нитрофенила определяется непосредственно колориметрически [26].

Уровень холинэстеразной активности в эритроцитах определяется рядом методов: 1) непосредственный анализ красных кровяных клеток [29]; 2) определение холинэстеразной активности сыворотки или плазмы и цельной крови и гематокрита [30]; 3) анализ цельной крови в таких условиях, при которых активность плазмы можно не принимать во внимание [31].

Колориметрические методы превосходят все остальные своей простотой и точностью. Можно пользоваться предназначенными специально для данной цели хромогенными холиновыми эфирами или более доступными нехолиновыми эфирами (фенола или нафтолов). Применение детергентов, которые рассматриваются в фосфатазных методах, значительно упрощает пользование нафтольными субстратами. Когда возникает сомнение в природе ферментов, проба с 10^{-5} *М* раствором эзерина позволяет надежно установить, имеют ли дело с алиэстеразой или с холинэстеразой. Обзор методов определения холинэстераз см. [32].

Липазы

Субстратом служит оливковое масло; гидролитическая активность человеческой сыворотки в отношении этого субстрата либо равна нулю, либо столь мала, что находится в пределах ошибки метода. Точное титрование мутной субстратной смеси едва ли возможно.

При оценке степени гидролиза оливкового масла человеческой сывороткой колориметрическими методами существует серьезное затруднение: липаза поджелудочной железы человека расщепляет оливковое масло и нафтиллаураты в относительной пропорции 1 : 6 или больше.

Поэтому, если расщепление оливкового масла сывороткой вызвано панкреатическим ферментом, расщепление 5 *мкмолей* масла в 1 час должно отвечать более чем 30 *мкмолям* нафтиллаурата. Результаты колориметрического определения имеют точность 0,1 *мкмоля*; поэтому надежные данные должны быть получены при количествах сыворотки менее 0,005 *мл*. Между тем в действительности никакой активности практически не удается обнаружить даже с количествами сыворотки, в 100 раз бо́льшими; это заставляет нас сомневаться в панкреатическом происхождении липазы сыворотки.

Можно полагать, что пригодными для определения липазы окажутся нафтиловые эфиры жирных кислот с длинной цепью (от C_{12} и выше), поскольку в присутствии таурохолата эстераза печени и

сыворотки крови человека на них практически не действует, но зато их энергично расщепляет липаза поджелудочной железы.

Зелигмэн и Нахлэс [32а] в качестве субстрата предложили β-нафтиллаурат. Они считают, что любая активация таурохолата служит признаком присутствия липазы поджелудочной железы, вызванным патологическим попаданием фермента в кровь. Попадание панкреатической липазы в сыворотку должно носить исключительный характер даже при очень высоком содержании амилазы в крови. Но этот метод очень ценен при исследованиях липазы в содержимом двенадцатиперстной кишки, в моче и других жидкостях.

Пригодность гидролизующего фермент препарата «туин» (эфиры жирных кислот с длинной цепью и растворимых в воде сорбитанполиэтиленовых гликолей) до сих пор не выяснена.

В книге о стандартных методах клинической химии, изданной американскими авторами, рекомендуется метод определения липазы по Гольдштейну и сотрудникам [33].

Фосфатазы

Субстратами для щелочной или кислой фосфатазы служит либо глицерофосфат, либо различные фосфаты фенолов и нафтолов. Хотя многие авторы специально подчеркивают необходимость применения именно β-глицерофосфата, в действительности разница в результатах, получаемых при помощи β-глицерофосфата и продажной смеси α- и β-изомеров, ничтожна.

Среди рекомендованных соединений флуоресцирующие фосфаты и фосфорилтирозин малодоступны и синтез их сложен. Фенилфосфат более доступен. Нитрофенилфосфат, фенолфталеинфосфат и нафтилфосфат довольно дефицитны, к тому же нитрофенилфосфат несколько неустойчив и при продолжительном хранении сильно разлагается. Поэтому если рекомендованы ароматические субстраты, лучше всего пользоваться фенилфосфатом. Хотя нитрофенилфосфат и фенолфталеинфосфат и обладают тем ценным преимуществом, что они непосредственно хромогенны (отчего можно обойтись без осаждения белков с последующим проявлением окраски), но это преимущество в значительной степени теряется вследствие лабильности нитрофенилфосфата и нелинейности результатов фенолфталеинового метода. Тем не менее пропорциональная зависимость величин активности фермента от результатов измерения при фенолфталеиновом методе наблюдается в гораздо более широких пределах, нежели при технике Боданского [1].

Если субстратом служит глицерофосфат, то определяемым продуктом расщепления является неорганический фосфат; если же пользуются ароматическими субстратами, то продуктом определения могут служить как неорганический фосфат, так и фенольная половина. Неорганический фосфат определяют после осаждения

[1] В. С. Асатиани. Биохимическая фотометрия. М., 1957, стр. 212.

белков одним из методов с молибденовым реактивом, которые отличаются один от другого в основном применяемым восстановителем. Применяемые в фотографии восстановители проявляют окраску несколько медленнее, нежели хлорное олово, однако, будучи явно менее чувствительными к второстепенным отклонениям, они в некоторых случаях более удобны, чем хлорное олово.

Фенол можно определять либо реактивом Фолина — Чиокалтеу, либо азосочетанием. В связи с тем, что стабильные диазониевые соли теперь доступны, они предпочтительнее реактива Фолина—Чиокалтеу, так как не осаждают белков, тем самым фильтрация и центрифугирование отпадают сами собой. Это тем более важно, что осаждающиеся белки захватывают с собой столь большие количества реактива, что в некоторых случаях получаются заведомо заниженные результаты. Нафтоловые азокрасители довольно плохо растворимы, и их, как правило, извлекают из смеси этилацетатом. Однако известен вариант метода Гомори [34], при котором азокраситель сохраняется в растворе, позволяет проводить прямую колориметрию без предварительного осаждения.

В качестве субстрата фенилфосфат часто предпочитают глицерофосфату, так как первый в большей степени расщепляется как щелочной, так и кислотной фосфатазой. Активность можно определять как относительно фенола, так и относительно неорганического фосфата. Фосфатный метод имеет то преимущество, что контрольные пробы дают содержание неорганического фосфата в сыворотке в виде свободного продукта. С другой стороны, при определении ферментативной активности объектов, содержащих большое количество неорганического фосфата (например, моча), более точные результаты получают фенольным методом.

Технику, при которой субстратом служит глицерофосфат, часто называют методом Боданского (см. сноску на стр. 477), технику же, при которой употребляют фенилфосфат, а освободившийся фенол определяют реактивом Фолина—Чиокалтеу,—методом Кинга и Армстронга, хотя предписания соответствующих авторов часто не соблюдают.

Некоторым ограничением методов определения фосфатаз, использующих в качестве субстратов глицерофосфат и фенилфосфаты, служит то обстоятельство, что они малопригодны, когда необходимо вести определения активности фермента в течение длительного промежутка времени и в широком диапазоне pH. В этих случаях можно использовать в качестве субстрата фосфорил-моносалициловую кислоту (активатор ионы Mn) для определения как кислой, так и щелочной фосфатазы (фосфомоноэстеразы). Пределы допустимых крайних значений pH составляют при этом 3,5—10,0. Фотометрическое измерение ведут при длине волны 295—300 *ммк*.

Щелочная фосфатаза. Если пробу хранить в замороженном состоянии, то сыворотка или плазма сохраняется совершенно не изменившейся до 7 дней. Изредка наблюдается незначительное повышение активности (до 20%) в течение первых двух дней

хранения. Если плазму хранят на сухом льду, то в нее проникает значительное количество углекислоты, которое нарушает pH смеси субстрата.

Субстраты. Как было упомянуто, большинство авторов пользуется глицерофосфатом или фенил-фосфатом. Если пользоваться в качестве субстрата 5-нуклеотидом, то можно раздельно распознать в крови фосфатазы печеночного и костного происхождения [1].

Оптимальные условия. Большинство авторов считает, что оптимальное значение pH для щелочной фосфатазы составляет около 9,3,если субстратом служит глицерофосфат, и около 9,8, если субстратом является фенилфосфат.

Степень гидролиза и оптимальная величина pH зависят в известной степени и от природы и концентрации применяемого буфера. Очень важно, чтобы буфер обладал достаточным равновесием при pH около 9,3. Подходящими буферами для обоих субстратов являются: карбонат — бикарбонат, аммиак — хлористый аммоний, глицин — едкий натр и амидол; буру следует применять только с фенилфосфатом, так как она несколько тормозит расщепление глицерофосфата. У рекомендуемого обычно в качестве буфера барбитала буферная емкость при pH 9,3 мала.

В качестве активатора необходимо применять соль магния, особенно при долгой инкубации, так как в его отсутствии происходит быстрое падение активности щелочной фосфатазы. Если пользуются сравнительно большими количествами сыворотки, то в ней самой содержится достаточно магния.

Кислая фосфатаза. В замороженном состоянии активность кислой фосфатазы в сыворотке не меняется в течение неопределенно долгого времени; при комнатной температуре она быстро падает.

Кровь человека содержит несколько кислых фосфатаз. Нормальная кислая фосфатаза крови (неустановленного происхождения) не тормозится тартратом, фосфатаза простатного происхождения, напротив, тормозится; активность кислой фосфатазы (или, точнее, фосфатаз, ибо их в данном случае, видимо, две) эритроцитов тормозится только при pH ниже 4,8. Активность этого фермента или ферментов эритроцитов подавляется полностью 0,5%-ным раствором формальдегида, но не изменяется под влиянием 0,005 *M* раствора фторида, 40%-ного спирта и температуры до 37 .

Поведение простатного фермента как раз обратное. Поскольку ферментативная активность эритроцитов превышает активность сыворотки в 40—100 раз, даже небольшое торможение может привести к ошибочно высоким показаниям и в тех случаях, когда применяется торможение добавлением формальдегида. В сомнительных случаях, чтобы убедиться, что повышенная активность вызвана простатным ферментом, всегда следует ставить две контрольные серии определений: с формальдегидом и фторидом.

---

[1] В. С. Асатиани. Биохимическая фотометрия. М., 1957, стр. 213.

Субстраты. Поскольку степень расщепления фенилфосфата кислой фосфатазой в 2,5—10 раз больше таковой глицерофосфата, предпочтение отдается первому. Аналогична степень расщепления и остальных субстратов, например нитрофенилфосфата.

Оптимальные условия. Оптимальные pH для кислой фосфатазы при использовании фенолфосфатазы в качестве субстрата составляют 5,9 по Гутману и Гутману [35], 4,8—5,2 по Кингу [26]. Большинство авторов пользуется ацетатным или цитратным буфером с pH 4,9—5,0.

Щелочная фосфатаза в нормальной сыворотке определяется в α_2-глобулиновой фракции, а в сыворотке с повышенной активностью— также и в α_1-глобулиновой фракции. Кислая фосфатаза как в нормальной сыворотке, так и в сыворотке с повышенной активностью определяется в α_2-глобулиновой фракции.

Фториды ингибируют сывороточную кислую фосфатазу, оксалат ингибирует как кислую, так и щелочную фосфатазы. Тот факт, что при разведении сыворотки активность фосфатазы в некоторых случаях повышается, можно объяснить разбавлением ингибиторов, присутствующих в сыворотке. На фосфатазную активность может повлиять и буферная система, которой пользуются при определении активности. Ионы магния активируют щелочную фосфатазу; поэтому некоторые авторы при определении фосфатазной активности пользуются добавлением этих ионов; однако иногда ионы магния не оказывают активирующего влияния на щелочную фосфатазу; наблюдающееся при некоторых патологических состояниях повышение фосфатазной активности в сыворотке крови происходит вследствие фактического повышения содержания фермента, а не из-за наличия активаторов.

Степень гидролиза моноэфиров ортофосфорной кислоты можно определить измерением ионов фосфора или других радикалов субстрата. В методах, использующих в качестве субстрата глицерофосфат, определяются высвобожденные ионы фосфора; при применении фенилфосфата определяется фенол, а с *п*-нитрофенилфосфатом — *п*-нитрофенил по его желтой окраске в щелочной среде. Первые два метода требуют осаждения белков, тогда как при *п*-нитрофенилфосфатном методе в этом нет необходимости. Гидролиз моноэфиров теоретически дает эквимолярные количества фосфата и органического радикала; исследования не показали, что ионы фосфата высвобождаются в количестве меньшем, чем другие радикалы. Однако при работе с сывороткой разница составляет 9%. Это вызвано вовлечением части фосфата в процесс трансфосфорилирования.

При анализе щелочно-фосфатазной активности сыворотки обычно определяется сумма нескольких щелочных фосфатаз.

Определение липазы [1]

П р и н ц и п. Исследуемую пробу инкубируют с субстратом — забуференной фосфатом эмульсией оливкового масла. Количество жирных кислот, освободившихся в результате гидролиза, опреде-

ляют титрованием щелочью, используя pH-метр или тимолфталеин в качестве индикатора.

Реактивы. 1) субстрат из оливкового масла: к 1 части (по объему) оливкового масла добавляют 1 часть 5%-ного водного раствора аравийской камеди, содержащего 0,2% бензоата натрия. Эмульгируют в ручном гомогенизаторе до получения белой однородной эмульсии или в автоматическом гомогенизаторе в течение 15 мин. Субстрат можно хранить около месяца в холодильнике. Однако через 2 недели после приготовления эмульсия расслаивается; если после взбалтывания разделение происходит вновь, эмульсию выливают; 2) M/15 фосфатный буфер, pH 7,1; для этого 0,58 *г* безводного Na_2HPO_4 · 0,35 *г* KH_2PO_4 растворяют в воде, объем доводят до 100 *мл*; 3) 0,050 н. раствор едкого натра; 4) тимолфталеин, 1%-ный раствор в этаноле; 5) этанол 96%-ный.

Техника. В пробирку емкостью 12—15 *мл* отмеряют: 3 *мл* воды, 0,50 *мл* буфера, 2,0 *мл* субстрата и 1,0 *мл* сыворотки крови, перемешивают. Пробирку закрывают пробкой (лучше притертой стеклянной) и помещают в термостат (37—40°) на ночь (около 16 час.). Хотя оптимальная температура 40°, в большинстве лабораторий инкубирование проводят при 37° [1]. После этого содержимое пробирки перемешивают и переносят в эрленмейеровскую колбу емкостью 25 *мл*, пробирку хорошо ополаскивают 3 *мл* этанола, и содержимое пробирки добавляют в колбу. Раствор в колбе титруют 0,050 н. раствором едкого натра до pH 10,5 или же добавляют 2 капли индикатора тимолфталеина и титруют до развития синей окраски. Для каждой серии определений ставится холостой опыт. Для этого в пробирку отмеривают 3,0 *мл* воды, 0,50 *мл* буфера и 2,0 *мл* субстрата, перемешивают, закупоривают, инкубируют как опыт, но сыворотку добавляют непосредственно перед титрованием [2].

Вычисление. Активность липазы в исследуемой пробе выражают в *мл* 0,050 н. раствора едкого натра, израсходованного на титрование образовавшихся жирных кислот в 1 *мл* пробы. Она равна разности между количеством 0,05 н. раствора NaOH, израсходованным на титрование 1 *мл* исследуемой пробы, и количеством щелочи, ушедшей на титрование холостого опыта. В оригинальной методике в качестве индикатора был использован фенолфталеин, который меняет окраску при pH 8,8. При таком pH протитрованными оказываются лишь 70% жирных кислот. Тимолфталеин в условиях опыта окрашивается в интенсивный ярко-синий цвет при pH 10,5.

---

[1] Хотя в оригинальном методе указывается 24-часовая инкубация, однако практически вполне достаточно и 16 час., т. е. можно ставить в термостат после полудня и титровать на следующее утро. В случае необходимости инкубационное время можно сократить до 4 час. и для получения приблизительно такого ответа, как при 16 час. инкубации, конечный результат помножить на 2.

[2] Гемоглобин ингибирует «панкреатическую» липазу. Так, 0,16 *г* гемоглобина в 100 *мл* не дают ингибирующего эффекта, в то время как 0,5 *г*/100 *мл* вызывает 50%-ное ингибирование.

Изменения окраски очень резкие: при pH 10,1 — слабо-синяя, pH 10,5 — ярко-синяя, а при pH 10,8 — темно-синяя. Однако найдено, что не менее 5% ошибки приходится на титрование к моменту получения «ярко-синей окраски». Поэтому нет необходимости ставить холостой опыт для каждой сыворотки отдельно.

Сыворотка крови стабильна при хранении в течение одной недели при комнатной температуре и в течение нескольких недель в холодильнике. Липолитическая активность может повыситься при хранении вследствие размножения микробов. При активности 3,5 ед. воспроизводимость метода ±10%. Нормальная активность сыворотки до 1,5 ед.

Микрометод. Если сыворотки мало, то можно пользоваться микробюреткой и брать в 4 раза меньше сыворотки, чем в макрометоде, т. е. 0,25 *мл*. Соответственно нужно уменьшить в 4 раза объемы всех остальных растворов и титрование проводить пользуясь микропипеткой.

Определение панкреатической липазы [2] (КФ 3.1.1.3)

Гидролиз жира под влиянием фермента регистрируется по сдвигу pH, вызывающему изменение окраски индикатора нейтральрота в присутствии боратного буфера определенной емкости.

К качестве субстрата для действия липазы используют трибутирин, реакция расщепления которого, в отличие от многих других жиров, протекает необратимо под влиянием указанного фермента. Это, по-видимому, связано с растворимостью в воде продуктов реакции (масляной кислоты).

Принцип. Метод основан на нахождении одного и того же определенного эффекта в систематическом ряду разведений исследуемого материала. Благодаря большому разведению материала есть возможность наблюдать ферментное действие в условиях снятия или ослабления влияния естественных ингибиторов, нередко сопутствующих ферменту.

Для эмульгирования жира, что является необходимым условием действия липазы, применяется раствор желатины. Трибутирин, эмульгированный в присутствии желатины, расщепляется липазой интенсивно; добавление холевокислого натрия, а также солей кальция в избранных условиях не оказывает сколько-нибудь значительного активирующего действия.

pH буфера, равный 8,5, после прибавления желатины и трибутирина снижается и в самом начале гидролиза становится близким к 8, т. е. равным оптимальному значению для действия липазы. В дальнейшем pH смещается в кислую сторону.

Реактивы: 1) 0,1н. раствор HCl (точный раствор); 2) 0,2 *M* раствор борной кислоты в точно 0,1н. растворе едкого натра (12,368 *г* борной кислоты растворяют в 0,1н. растворе едкого натра, и общий объем доводят таким же раствором щелочи до 1 *л*). Из реак-

тивов 1 и 2 приготовляют буферную смесь, содержащую 3,5 части первого и 6,5 второго реактива. Полученная смесь должна иметь pH 8,5, емкость ее проверяется титрованием: на 5 *мл* буферной смеси должно идти для нейтрализации по метилоранжу 7,0 *мл* 0,02 н. HCl (или серной кислоты); 3) 0,2%-ный раствор нейтральрота в 60%-ном этиловом спирте (нейтральрот растворяют в спирте и затем добавляют необходимое количество воды); 4) 2%-ный раствор желатины (пищевую желатину растворяют при нагревании до 50—60°; раствор годен 3—4 дня при хранении в холодильнике, перед употреблением слегка нагревают до разжижения; 5) трибутирин. Непосредственно перед употреблением приготовляют смесь реактивов: 2 *мл* буферной смеси, 2 *мл* раствора желатины, 4 *мл* дистиллированной воды, 0,2 *мл* трибутирина (количества, необходимые для одного определения в 7 пробирках). Смесь интенсивно встряхивают в течение 3 мин. (эмульсия расслаивается в течение 20 и более минут).

Техника. Панкреатический сок собак разводят дистиллированной водой в соотношении 1 : 1000 или 1 : 10 000, а дуоденальное содержимое человека — 1 : 300; 1 : 1000 и т. п. в зависимости от ожидаемого содержания липазы.

Из этого раствора приготовляют ряд возрастающих разведений, в котором количество липазы уменьшается каждый раз на одну треть. Для этого в 7 (или 10) пробирок наливают по 1 *мл* дистиллированной воды, за исключением первой пробирки. В первую пробирку вместо воды наливают 1 *мл* разведенного панкреатического сока. 2 *мл* того же разведенного сока наливают во вторую пробирку. Далее, путем смешения и переноса по 2 *мл* жидкости из каждой пробирки в последующую, получают ряд разведений, так же как это делается при определении энтерокиназы или щелочной фосфатазы. Затем во все пробирки приливают по 1 *мл* указанной смеси реактивов, которую перед этим интенсивно встряхивают. Помещают пробирки на 1 час в термостат при 37°, после чего в каждую из них прибавляют по 2 капли раствора нейтральрота.

Окраска раствора в красный цвет (pH 6,8 и ниже) свидетельствует о достаточном действии липазы. При правильном разведении материала это наблюдается только в части пробирок. Окраска раствора в других пробирках в желтый цвет указывает на отсутствие нужной степени расщепления трибутирина. Регистрируют последнюю пробирку с красным окрашиванием раствора (т. е. с наименьшим количеством панкреатического сока).

Вычисление. За условную единицу принимается 10-кратное количество липазы по сравнению с тем ее минимумом, который в описанных условиях освобождает из трибутирина количество масляной кислоты, достаточное для нейтрализации буферной смеси до pH 6,8.

Количество условных единиц в 1 *мл* исследуемого сока вычисляется по формуле: $\frac{Y}{0,1 \cdot a}$, где a — количество разведенного сока в последней пробирке с красным окрашиванием раствора; Y — пред-

варительное разведение сока, 0,1 — коэффициент для перевода в принятые единицы. Этот коэффициент удобен при использовании получаемых условных величин.

Количество ферментного раствора

Номера пробирок	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Количество разведенного сока (*a*)	1,00	0,67	0,45	0,30	0,20	0,13	0,09	0,06	0,04	0,027

Возможная ошибка описанных определений составляет около 20%.

В качестве примера можно привести некоторые данные отдельных исследований. Так, содержание липазы, установленное настоящей методикой, равнялось: в панкреатическом соке собаки, отделяемом при скармливании мяса, 500—1000 *ед/мл* и жира 2000—4000 *ед/мл*; в дуоденальном соке больных (без резких нарушений деятельности пищеварительного тракта), полученном после введения соляной кислоты, 400—700 *ед/мл*, после введения подсолнечного масла 900—2500 *ед/мл*.

Определение липазы [3]
(КФ 3.1.1.3)

Принцип. Метод основан на липолитическом расщеплении субстрата β-нафтиллауриновой (или β-нафтилстеариновой кислот) с освобождением нафтола, который затем связывается диортоанизидином, что позволяет закончить анализ фотометрическим измерением.

Реактивы: см. «Техника».

Техника: 0,1 *мл* сыворотки (или разбавленного водой в пропорции 1 : 20 панкреатического сока) добавляют к субстрату (0,2 *мл* 1%-ного раствора β-нафтиллауриновой или β-нафтилстеариновой кислоты в ацетоне плюс 1 *мл* вероналового буфера, pH 7,4) и выдерживают 30 мин. при 37° (контролем служит аналогичная проба сыворотки без субстрата). Затем добавляют 1 *мл* 1%-ного раствора диортоанизидина и через 3 мин. — 0,4 *мл* 5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. После встряхивания добавляют 2,5 *мл* этилацетата, снова встряхивают, центрифугируют и фотометрируют при 540 *ммк*. Калибровочную кривую строят по серии стандартных (от 0,1 до 1%) растворов β-нафтола. При температуре 37° и pH 7,4 описанный метод обладает достаточной чувствительностью и специфичностью и дает воспроизводимые результаты. В случае отсутствия в пробе липазы метод позволяет определять активность эстераз. Фотометрическое измерение, лежащее в основе метода, делает его простым и удобным. Проверка его в лабораторных условиях показала, однако, что стабильность получаемых результатов не совсем удовлетворительна. Метод, очевидно, нуждается в доработке. Детали см. [8].

Описанный метод можно применить и для определения липазной активности в молоке и молочных продуктах. Результаты такого анализа используют для суждения о степени расщепления жиров.

Определение липазы (по гидролизу оливкового масла) [4] (КФ 3.1.1.3)

П р и н ц и п. Исследуемой сывороткой воздействуют на стабилизированную суспензию оливкового масла. Выделившиеся жирные кислоты титруют 0,05 н. раствором едкого натра.

Р е а к т и в ы: 1) стабилизированная суспензия оливкового масла: 93 *мл* дистиллированной воды, 0,2 *г* бензоата натрия и 7 *г* гумми-арабика хорошо смешивают. Прибавляют медленно 93 *мл* оливкового масла и эмульгируют 10—15 мин. в гомогенизаторе или эмульгаторе, сначала на малых, а потом на больших оборотах. Эмульсия сохраняется 6 месяцев при 10—14°. Перед употреблением ее размешивают; 2) 0,2 *М* трис-буфер с рН 8,0: 50 *мл* 0,4 *М* раствора трис-гидроксиметиламинометана (48,4 *г/л*) смешивают с 26,8 *мл* 0,4 н. HCl и дополняют до 100 *мл* водой; 3) индикаторный раствор: 1,0 *г* тимолфталеина в 100 *мл* этанола; 4) 0,05 н. раствор едкого натра — точный, не содержащий карбонатов. Сохранять в полиэтиленовой бутылке (можно в сосуде из нейтрального стекла).

Т е х н и к а. 0,25 *мл* воды, 0,3 *мл* суспензии оливкового масла, 0,1 *мл* буфера и 0,1 *мл* сыворотки размешивают хорошо в широкой пробирке, после чего инкубируют 6 час. на водяной бане при 37°. Прибавляют 0,3 *мл* 95%-ного этанола и одну каплю индикаторного раствора. После перемешивания титруют 0,05 н. раствором едкого натра. Параллельно проводят слепую пробу, в которой 0,1 *мл* сыворотки прибавляют после инкубации и после прибавления этанола.

Вычисление. Нормальные величины активности в сыворотке крови от 0,5 до 1,5 *Е*.

Активность липазы в условных единицах (*Е*) вычисляют по формуле:

$$E = (a - b) \cdot 10,$$

где *a* — количество *мл* 0,05 н. раствора NaOH, израсходованное на титрование опытной пробы, *b* — количество *мл* 0,05 н. раствора NaOH, израсходованное на титрование слепого опыта.

Нательсон [5] предложил модификацию, по которой работают без предварительно стабилизированной суспензии оливкового масла, применяя фосфатный буфер вместо трис-буфера.

Р е а к т и в ы: 1) оливковое масло; 2) раствор гумми-арабика: 12,5 *г* в 100 *мл* теплой воды; 3) фосфатный буфер с рН 7—7,5: 3 *мл* 0,066 *М* KH_2PO_4 (9,079 *г/л*) + 10 *мл* 0,066 *М* Na_2HPO_4 (17,87 *г* $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ в 1 *л*); 4) 0,05 н. KOH — точный раствор, не содержащий карбонатов. Сохраняют в полиэтиленовой бутылке

(можно в сосуде из нейтрального стекла); 5) 0,2%-ный спиртовый раствор фенолфталеина.

Техника. 1 *мл* фосфатного буфера, 0,2 *мл* сыворотки, 0,5 *мл* раствора гумми-арабика и 0,2 *мл* оливкового масла хорошо размешивают до гомогенизирования в эрленмейеровской колбе. Колбу закупоривают корковой пробкой и инкубируют в водяной бане 24 часа при 37°. Прибавляют 2 *мл* метанола и титруют 0,05 н. раствором KOH при индикаторе фенолфталеине. Параллельно проводят слепую пробу, при которой сыворотку прибавляют непосредственно перед титрованием.

Вычисление:

$$E = (a - b) \cdot 5$$ (обозначения — см. стр. 485).

Нормальные величины в сыворотке крови около 0,5 ед. Детали метода см. [5а].

Этот вариант лишен технических неудобств, связанных с применением масляных эмульсий, но сохраняет основной недостаток титриметрических измерений в масляной среде: неотчетливость конечного момента титрования. Поэтому, несмотря на простоту описанных выше титриметрических методов, им нельзя отдать предпочтение из-за недостаточной стабильности получаемых результатов.

Определение липазы [6] (КФ 3.1.1.3)

Принцип. В оптимальных условиях, предусматривающих подбор соответствующего эмульгирующего реагента, буферного раствора, pH гидролизата и продолжительности гидролиза, определение активности липазы можно провести в течение первого часа ферментативного гидролиза триглицерида.

Реактивы: 1) забуференный раствор субстрата: 1,21 *г* триса (гидроксиметиламинометана) и 1 *г* бензоата натрия растворяют в 500 *мл* дистиллированной воды. Раствор помещают в гомогенизатор Уорринга (или пользуются мешалкой с такой же скоростью вращения) и добавляют в него 10 *г* акациевого и 50 *мл* оливкового масла, гомогенизируют в течение 10 мин., затем оставляют для уравновешивания не менее чем на 4 часа. Доводят pH этой смеси до 8,5, добавляя по каплям 1н. соляную кислоту. Полученная эмульсия хорошо сохраняется в рефрижераторе, при сдвиге pH, прибавляют небольшое количество кислоты или щелочи, вновь доводя pH до 8,5. Перед употреблением эмульсию энергично взбалтывают или кратковременно гомогенизируют. Измерение pH эмульсии проводят при комнатной температуре; 2) стандартный раствор щелочи: 0,01 н. едкий натр или едкое кали; 3) 4%-ный раствор фенолфталеина: 1 *г* фенолфталеина растворяют в 25 *мл* 95%-ного этанола.

Техника. Титрование в присутствии индикатора. Отмеряют пипеткой 1 *мл* сыворотки в колбу Эрленмейера емкостью 150 *мл* и ставят в рефрижератор (слепой опыт). В две большие пронуме-

рованные пробирки вливают по 10 *мл* забуференного субстрата, ставят в водяную баню при 37°. После того как жидкость в пробирках примет температуру бани (около 10 мин.), в одну из пробирок вливают 1 *мл* сыворотки. Содержимое перемешивают, вновь помещают в водяную баню и отмечают время.

По прошествии 1 часа обе пробирки достают из бани. Затем содержимое пробирки переносят в колбы Эрленмейера емкостью 150 *мл*. В колбу, куда переносят жидкость из пробирки, содержащей сыворотку, предварительно наливают 30 *мл* 95%-ного этанола. Достают из рефрижератора склянку с 1 *мл* сыворотки и добавляют в нее такое же количество этанола и 10 *мл* забуференного субстрата. Для лучшего перемешивания и во избежание потерь жидкости многократно переливают из пробирок в склянки и обратно. В каждую колбу добавляют по 3 капли спиртового раствора фенолфталеина и тщательно перемешивают. Содержимое всех трех колб титруют 0,01 н. едким натром, пользуясь при этом магнитной мешалкой. Вначале титруют обе контрольные пробы до ясного малинового цвета, затем титруют жидкость, содержащую гидролизат, сравнивая окраску в конечной точке с окраской жидкостей в контрольных пробах.

Вычисление. Из количества щелочи, пошедшей на титрование опытной пробирки, вычитают количество щелочи, пошедшей на титрование слепой пробы, разность умножают на 10. Полученной величиной выражается активность липазы в микромолях жирных кислот, отщепленных от субстрата 1 *мл* сыворотки в течение часа.

Электрометрическое титрование. Для его проведения требуется pH-метр с ценой деления шкалы 0,01.

1 *мл* сыворотки наливают в коническую колбу и помещают ее в рефрижератор (слепое определение). 10 *мл* забуференного субстрата наливают в пробирку достаточно большого размера и оставляют стоять при комнатной t°. Во вторую колбу наливают 10 *мл* субстрата и 1 *мл* сыворотки и тщательно перемешивают. Определяют pH смеси, записывают, затем содержимое склянки переносят в пробирку и помещают ее в водяную баню при 37° вместе с пробиркой, содержащей забуференный субстрат без сыворотки. По прошествии 1 часа достают обе пробирки из водяной бани и, одновременно, из рефрижератора склянку с 1 *мл* сыворотки. Пробирки охлаждают до комнатной температуры, для этого в одну из них опускают термометр и держат пробирки в ледяной воде до тех пор, пока температура не опустится до уровня выше комнатной на 4°, затем содержимое пробирок перемешивают. В случае необходимости пробирки вновь опускают в ледяную воду или слегка согревают их рукой.

После того как жидкость в пробирках примет комнатную температуру, ее переливают в склянки, в эмульсию, содержащуюся в склянке, погружают электроды pH-метра и титруют 0,01н. едким натром до такого значения pH, при котором начался гидролиз. Вся процедура должна быть закончена в течение 2—3 мин. после

извлечения пробирок из водяной бани, поэтому применение ингибитора для остановки ферментативной реакции излишне.

Эмульсию из контрольной склянки переливают в колбу, содержащую 1 *мл* сыворотки и определяют pH этой смеси. Если значение pH отклонилось от начального, вносят соответствующую поправку. Величину поправки определяют не повторным титрованием, а по расчету, прибавляя по 0,1 *мл* 0,01н. щелочи на каждую 0,01 единицы pH при отклонении pH пробы от начального значения в щелочную сторону и таким же образом вычитая, в случае отклонения pH пробы от ее начального значения в кислую сторону.

Вычисление. Количество *мл* 0,01н. едкого натра, пошедших на титрование, умножают на 10, получают величину активности липазы, обусловившей отщепление от субстрата жирных кислот, в микромолях на 1 *мл* сыворотки за 1 час.

Как указывают авторы [6], в большинстве методов, предложенных для определения активности липазы, инкубация субстрат-ферментной смеси требует значительного времени (по данным разных авторов от 3 до 24 час.), что связано с необходимостью накопления минимально определимых количеств продуктов реакции. Вместе с тем известно, что активность фермента может быть точно измерена лишь в начальном периоде ферментативной реакции. В предложенном методе подбор эмульгирующего агента (акациевого масла) позволил сократить время инкубации до одного часа.

Метод пока не проверен другими лабораториями. Электрометрическое титрование, технически несколько усложняющее метод, должно способствовать повышению точности титрования.

Определение липопротеиновой липазы [1] [7]
(КФ 3.1.1.3)

Принцип. Плазму или кровь инкубируют с приготовленной соответствующим образом эмульсией оливкового масла. Показателем активности фермента является количество освободившихся свободных жирных кислот.

Реактивы: 1) субстрат: 96 *мл* $M/15$ раствора фосфатного буфера с pH 7,5 (фосфатный буфер готовят, смешивая 84,1 *мл* $M/15$ раствора Na_2HPO_4 с 15,9 *мл* $M/15$ раствора KH_2PO_4) — первый раствор содержит в 1 *л* 9,47 *г* Na_2HPO_4; в 1 *л* второго раствора содержится 9,08 *г* KH_2PO_4, 4,0 *мл* оливкового масла и 300 *мг* лецитина, эмульгируют в гомогенизаторе в течение 2,5 мин. Перед употреблением эмульсии для ферментативной реакции в отмеренном количестве эмульсии растворяют сухую плазму крови до конечной концентрации 3,5% и гепарин в количестве 1 *ед/мл*; 2) экстракционная смесь: смешивают изопропиловый спирт 40 частей, гептан 10 частей, 1 н. серная кислота 1 часть; 3) 0,018 н. раствор NaOH.

[1] Субстратом для фермента являются липопротеиновые комплексы. Относительно определения активности фермента в тканях см. [7а].

Т е х н и к а. После внутривенного введения гепарина (обычно в дозе 1 *мг/кг* веса тела) через определенное время (лучше всего 15—30 мин.) берут кровь из вены локтевого сгиба и центрифугируют для отделения плазмы. В пробирку с пришлифованной стеклянной пробкой отмеривают 0,8 *мл* субстрата и помещают в водяную баню при температуре 37°. Через 2—3 мин., необходимых для выравнивания температуры, прибавляют 0,2 *мл* подогретой до той же температуры активной исследуемой плазмы, смесь перемешивают и инкубируют в течение 30 мин. После этого прерывают реакцию, прибавляя 5 *мл* экстракционной смеси. Содержимое пробирки тщательно встряхивают, а затем прибавляют 3 *мл* гептана и 3 *мл* дистиллированной воды. Следующей операции необходимо уделить особое внимание—это один из самых ответственных моментов в ходе анализа. После повторно тщательного встряхивания набирают пипеткой 3 *мл* гептана, находящегося в верхнем слое жидкости, переносят в центрифужную пробирку, прибавляют 1 *мл* индикатора (0,01%-ный раствор нильской синей в 90%-ном этаноле) и титруют свободные жирные кислоты при помощи 0,018 н. раствора едкого натра. Для титрования лучше всего пользоваться микробюреткой, которую можно самим сделать из стеклянного туберкулинового шприца, поршень которого продвигают при помощи микрометрического винта. Микробюретку следует предварительно откалибровать на ход микрометрического винта при помощи известных стандартных растворов олеиновой кислоты, определенных таким же образом. Во время титрования смесь постоянно перемешивают при помощи струи азота, свободного от CO_2 (газ пропускают через мокрый газоочиститель с едким натром). Увеличение количества жирных кислот в инкубированной пробе рассчитывают по разнице в титровании опытной и слепой проб. Слепую пробу приготавливают, как и опытную, с той разницей, что реакцию в слепой пробе прерывают при помощи экстракционной смеси еще перед началом инкубации. Результат коррегируют на собственный гидролиз субстрата в течение 30 мин. при температуре 37°. Израсходованное количество едкого натра следует умножить на $^4/_3$ для пересчета на количество жирных кислот, оставшихся в пробирке в 1 *мл* гептана. Единицей активности фермента является количество освобожденных микромолей жирных кислот в 1 *мл* плазмы в течение 1 часа в описанных условиях.

Согласно описанной методике можно произвести анализ крови, взятой из мякоти пальца, после введения испытуемому гепарина. 0,2 *мл* крови из пальца смешивают с 0,8 *мл* подогретого субстрата и инкубируют в течение 1 часа при температуре 37°. Параллельно ставят слепую пробу (как выше). Активность фермента рассчитывают на объем плазмы, так как эритроциты не обладают ферментной активностью. Для этого необходимо определить показатель гематокрита исследуемой крови. Дальнейшее исследование выполняют, как описано выше.

Активность фермента в единицах рассчитывают по формуле:

$$\text{активность} = \text{количеству микромолей свободных кислот} \times 10 \times \frac{50}{100 - \text{гематокрит}}.$$

В среднем активность плазмы, взятой через 15 мин. после внутривенного введения гепарина в дозе 1 *мг/кг*, у здоровых людей равняется 10 единицам. Точность метода около 15%.

Определение фосфолипазы А [8]

(КФ фосфолипазы А — 3.1.1.4, В — 3.1.1.5)

Принцип метода заключается в определении количества освободившихся жирных кислот после инкубации сыворотки с субстратом, содержащим лецитин.

Реактивы: 1) 0,1 *М* раствор глицина в 0,05 *М* боратном буфере с pH 8,45; 2) раствор субстрата, содержащий 25 *мг* лецитина (31,1 *мкмоля*) и 20 *мг* (48,2 *мкмоля*) дезоксихолата натрия в 4 *мл* глицино-боратного буфера; 3) реактивы для определения свободных жирных кислот (см. [8а]).

Техника. Сыворотку и субстрат подогревают отдельно при температуре 55° в течение 30 мин. Затем смешивают 1 *мл* сыворотки с 1 *мл* субстрата и инкубируют в течение 18 час. при 55°. По истечении этого времени определяют прирост свободных жирных кислот методикой [8а] по отношению к слепой пробе, не содержащей сыворотки.

Определение активности фермента в содержимом двенадцатиперстной кишки производят с 1 *мл* содержимого, разбавленного водой в отношении 1 : 25. Время инкубации равно 1 часу. За единицу активности авторы принимают то количество фермента, которое в указанных условиях вызывает освобождение 0,0001 *мкмоля* жирных кислот из лецитина 1 *мл* дуоденального содержимого $\times 10^4$ (для избежания дробей) в течение 1 мин.

Подогревание сыворотки перед началом анализа до 55° и pH 8,45 исключают возможность освобождения жирных кислот липазой сыворотки из жиров. Это исключает также возможность действия фосфатазы В. В фосфатном буфере и pH 7,0 активность фермента была минимальной.

У здоровых людей активность сыворотки колеблется от 4 до 16, в среднем — 10 *ед/мл*.

Относительно определения активности фосфолипазы А в тканях см. [8б]. Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

Определение холинэстеразы [9]

(КФ 3.1.1.8)

Принцип. Активность холинэстеразы определяют электрометрическим измерением уменьшения величины pH после инкубации пробы с ацетилхолинбромидом или с ацетилхолинхлоридом при 25°

в течение 1 часа. При расчете учитывают поправку на уменьшение pH вследствие неспецифического гидролиза субстрата, что может произойти во время инкубации.

Реактивы: 1) буферный раствор для эритроцитов: а) основной раствор: в градуированный цилиндр емкостью 250 *мл* помещают 44,73 *г* KCl, добавляют горячую дистиллированную воду до метки на 175 *мл* и растворяют соль. В мерную колбу емкостью 200 *мл* отмеряют 100 *мл* этого раствора и растворяют в нем при встряхивании 4,124 *г* барбитурата натрия. Одновременно в стакан помещают 50 *мл* раствора KCl и растворяют в нем 0,545 *г* KH_2PO_4. Этот раствор и оставшийся в цилиндре раствор KCl переносят в мерную колбу емкостью 200 *мл*. Цилиндр и стакан споласкивают небольшим количеством воды и воду добавляют в колбу. Объем доводят до метки водой и содержимое колбы перемешивают. Нагревание можно использовать лишь при растворении KCl. Этот буферный раствор можно хранить при комнатной температуре в полиэтиленовой бутыли; б) рабочий раствор: к 20 *мл* основного раствора добавляют 75 *мл* дистиллированной воды и 2,5 *мл* 0,1н. раствора HCl, pH доводят до 8,10 добавлением раствора кислоты, смесь растворов переливают в мерную колбу емкостью 100 *мл* и объем доводят до метки водой. При стоянии буфер становится более кислым; если pH упал на 0,05 ед., нужно приготовить раствор заново; в) буфер для сыворотки или плазмы: разводят 32 *мл* рабочего буфера для эритроцитов, разбавляют водой до 100 *мл*, pH должен быть около 8,00. При хранении pH постепенно снижается, и когда он падает на 0,05—готовят свежий раствор; 2) субстрат. В качестве субстрата используется ацетилхолинбромид или ацетилхолинхлорид. Имеющийся в продаже бромид нужно перекристаллизовать следующим образом: растворяют 50 *г* ацетилхолинбромида в 100 *мл* теплого 95%-ного этанола, добавляют 100 *мл* эфира, фильтруют и кристаллы промывают еще раз эфиром. Кристаллы нужно высушивать в сушильном шкафу при 110° в течение 5 мин. или в вакуумэксикаторе всю ночь. Ацетилхолинхлорид из-за большой его гигроскопичности трудно взвешивать. Поэтому соль получают в ампулах, содержащих 100 *мг* ацетилхолинхлорида: а) субстрат для сыворотки плазмы готовят перед пользованием следующим образом: (1) растворяют 373 *мг* ацетилхолинбромида в 10 *мл* дистиллированной воды, или (2) 100 *мг* ацетилхолинхлорида (из ампулы) разбавляют водой до 3,3 *мл* в градуированной центрифужной пробирке; б) субстрат для эритроцитов готовят, добавляя 1 объем воды к 2 объемам субстрата для плазмы; 3) раствор сапонина, 0,01% : 10 *мг* сапонина растворяют в 100 *мл* дистиллированной воды; раствор готовят в день проведения анализа; 4) физиологический раствор: готовят 0,9%-ный раствор хлористого натрия в дистиллированной воде.

Макрометод для определения холинэстеразы в сыворотке или плазме

При помощи фосфатного буферного раствора устанавливают pH-метр на 7,0 и проверяют установку стандартными растворами с более низким pH (можно использовать растворы кислого фталата калия или кислого тартрата калия). Если электроды до этого были использованы в щелочных растворах, их опускают в 0,1 н. HCl на 10 мин. до начала определения.

В стакан емкостью 50 *мл* наливают 5 *мл* дистиллированной воды, 0,10 *мл* сыворотки или плазмы и 5 *мл* буфера для сыворотки или плазмы. Перемешивают и помещают стакан на 10 мин. в водяную баню при 25°.

Измеряют pH_1 пробы. Электроды ополаскивают водой и протирают тряпкой перед каждым определением. Добавляют 1 *мл* субстрата для плазмы или сыворотки, перемешивают, засекают время, и стакан вновь ставят в водяную баню (субстрат добавляется к серии анализов в течение не более 2 мин.).

Через 55 мин. пробу вновь устанавливают в pH-метр и ровно через 1 час после добавления субстрата измеряют pH пробы (pH_2).

Вычисление

$$\text{Холинэстеразные ед.} = \Delta pH/1 \text{ час} = pH_1 - pH_2 - b.$$

Значение *b* находят по таблице:

pH_2	*b*		pH_2	*b*	
	эритроциты	сыворотка или плазма		эритроциты	сыворотка или плазма
7,9	0,03	0,09	7,1	0,00	0,02
7,8	0,02	0,07	7,0	0,00	0,02
7,7	0,01	0,06	6,8	0,00	0,01
7,6	0,00	0,05	6,6	0,00	0,01
7,5	0,00	0,04	6,4	0,00	0,01
7,4	0,00	0,03	6,2	0,00	0,01
7,3	0,00	0,02	6,0	0,00	0,01
7,2	0,00	0,02			

Макрометод для определения холинэстеразы в эритроцитах. 0,1 *мл* собранных эритроцитов помещают в центрифужную пробирку, содержащую 5 *мл* 0,9%-ного раствора NaCl, перемешивают, центрифугируют и надосадочную жидкость сливают. К осадку добавляют 5 *мл* раствора сапонина, перемешивают, переносят в стакан емкостью 50 *мл* и далее продолжают анализ, как для сыворотки, используя, конечно, соответствующие буфер и субстрат.

Микрометод. Для микрометода берут реактивы в 5 раз меньших количествах. Используют пипетки на 20 *мл*, стакан емкостью 5 *мл*, pH-метр типа Бекмана, маленькие электроды.

Замечания. *1. Сыворотка — плазма*. Анализ сыворотки и плазмы дает идентичные результаты. Если требуется определить уровень холинэстеразы в эритроцитах той же пробы крови, удобно пользоваться антикоагулянтами, и создается возможность определять холинэстеразы плазмы и эритроцитов в одной пробе. Из антикоагулянтов лучше пользоваться гепарином, так как другие антикоагулянты (цитрат, оксалат и т. п.) дают комплексные соединения с двухвалентными ионами (Ca^{++}), активирующими холинэстеразу.

2. pH-метрирование можно проводить любым pH-метром с точностью $\pm$ 0,05 ед.

3. Температура. Майкел [9] указывает температуру 25°. Однако если комнатная температура 25 $\pm$ 1°, нет необходимости инкубирования в водяной бане.

4. Устойчивость проб. Устойчивость холинэстеразной активности плазмы или сыворотки, по разным данным, варьирует от 6 час. до 10 дней. В холодильнике пробы крови стабильны в течение 1 недели, а в замороженном виде — в течение нескольких месяцев. Пробы эритроцитов, высушенные на фильтровальной бумаге, можно хранить в сухом виде около 1 недели и дольше.

При гемолизе холинэстеразная активность эритроцитов падает, а активность сыворотки повышается.

Точность метода $\pm$ 15%. Величина оптимального pH для определения холинэстеразной активности сыворотки составляет, по разным данным, 8,4 — 8,5. Однако если анализ производить при pH 8,5, то неферментативный гидролиз субстрата может достичь значительных размеров. Поэтому активность фермента измеряется обычно при более низких значениях pH. Метод Майкела [9] рассчитан так, что понижение буферной емкости с 8 до 6 соответствует понижению активности фермента, что выражается падением pH на протяжении опыта. Кинетические исследования выявили прямолинейную зависимость между концентрацией фермента и ΔpH, и между ΔpH и временем. В методе Майкела имеются три источника ошибок: 1. Понижение буферной емкости не идет строго параллельно понижению активности фермента. Майкел ввел коэффициент поправки *f* для этого отклонения, но так как максимальное значение поправки около 2%, ею можно пренебрегать. 2. Коэффициент *b* — поправка на неферментативный гидролиз субстрата, который происходит во время инкубации. Этот коэффициент получают инкубированием холостых опытов в течение 1 часа и вносят поправку в значения pH_2. Это, конечно, не совсем правильно, так как обычно pH_2 достигается лишь в конце 1 часа инкубации. Из таблицы значений *b* видно, что величина поправки значительна лишь в том случае, если Δ pH/час ниже нормы. По этой причине в обычных анализах поправку можно не делать. 3. Скорость реакции в первые 5 мин. значительно отклонена от прямолинейности. Но при 1 часе инкубации

отклонение незначительно, и поэтому можно с ним не считаться.

Норма. Одни авторы [1] считают, что активность холинэстеразы, определяемая методом Майкел, несколько выше у мужчин по сравнению с женщинами, тогда как другими авторами [2] эта разница не обнаружена.

Определение активности по С. Н. Синицину [10] ведут следующим образом: кровь из пальца (около 1 *мл*) вносят в пробирку диаметром 0,5 *см* и высотой 4 — 5 *см*, которую ставят на 10 — 15 мин. в термостат или теплую воду с температурой 37°. После образования сгустка осторожно отделяют его от стенок пробирки тонкой стеклянной палочкой и центрифугируют оставшуюся в пробирке жидкость 15 мин. при 1500—2000 *об/мин*. Сыворотка должна быть прозрачной, без примеси гемолизированных эритроцитов; ее переносят при помощи пастеровской пипетки в чистую пробирку. Затем в три колориметрические пробирки наливают по 2 *мл* физиологического раствора, по 2 капли индикатора (0,004%-ный раствор фенолрота) и по 0,1 *мл* сыворотки. Третья пробирка служит контролем без сыворотки; если окраска опытных пробирок не совпадает с контрольной, то для выравнивания окраски растворов в пробирки добавляют по 1—2 капли 0,01н. раствора едкого натра.

Пробирки ставят на 15 мин. в термостат при температуре 37°. После этого в каждую пробирку прибавляют по 0,1 *мл* 2%-ного раствора ацетилхолинхлорида и снова ставят в термостат на 30 мин. Через 30 мин. в каждую пробирку прибавляют по 2 капли 5%-ного раствора прозерина для прекращения реакции образования уксусной кислоты из ацетилхолинхлорида. Содержимое пробирок титруют 0,01н. или 0,005н. раствором NaOH до выравнивания их окраски с таковой в контрольной пробирке. Переход окраски из желтой или желто-оранжевой в красную заметен очень хорошо.

Таблица для пересчета миллилитров уксусной кислоты на миллиграммы ацетилхолина

Миллилитры 0,01 н. раствора CH_3COOH	Ацетилхолин, *мг*	Миллилитры 0,01 н. раствора CH_3COOH	Ацетилхолин, *мг*
0,050	0,050	0,160	0,288
0,120	0,216	0,165	0,297
0,130	0,234	0,170	0,306
0,135	0,243	0,175	0,315
0,140	0,252	0,180	0,324
0,145	0,261	0,185	0,333
0,150	0,270	0,190	0,342
0,155	0,279		

[1] M. Oka. Acta med. Scand., 1954, Suppl., 293, 7.
[2] A. Sawitzki et al. J. Lab. Clin. Med., 1948, 33, 203.

Расчет. Активность холинэстеразы выражают количеством миллилитров 0,01 н. или 0,005 н. раствора щелочи, пошедших на титрование 0,1 *мл* сыворотки крови или в миллиграммах ацетилхолинхлорида, разлагаемого ферментом сыворотки (0,1 *мл*) за 30 мин. инкубации.

Пересчет количества миллилитров выделившейся 0,01н. уксусной кислоты на миллиграммы ацетилхолина можно произвести по таблице на стр. 494.

Определение активности холинэстеразы (по образованию ацетилгидроксамовой кислоты) [11]

П р и н ц и п. При взаимодействии ацетилхолина со щелочным раствором гидроксиламинхлорида образуется ацетилгидроксамовая кислота, которая в кислом растворе дает с хлорным железом цветную реакцию. Интенсивность окраски зависит от концентрации ацетилхолина. Точность метода ± 1%.

Р е а к т и в ы: 1) фосфатный буфер, рН 7,2 : смешивают 7 *мл* раствора двузамещенного фосфорнокислого натрия (23,752 *г* $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ растворяют в 1 *л* дистиллированной воды) и 3 *мл* раствора однозамещенного фосфорнокислого калия (18,156 *г* KH_2PO_4 растворяют в 1 *л* дистиллированной воды); 2) ацетатный буфер, рН 4,5: смешивают 6 *мл* раствора уксусной кислоты (11,4 *мл* ледяной уксусной кислоты растворяют в 1 *л* дистиллированной воды) и 4 *мл* раствора уксуснокислого натрия (27,2 *г* $CH_3COO\,Na \cdot 3H_2O$ растворяют в 1 *л* дистиллированной воды); 3) 0,04 *М* раствор ацетилхолинхлорида (0,7266 *г* ацетилхолинхлорида растворяют в 100 *мл* 0,001 *М* раствора ацетатного буфера с рН 4,5). Хранят на холоду; 4) 0,004 *М* раствор ацетилхолинхлорида (перед употреблением 0,04 *М* раствор ацетилхолинхлорида разбавляют девятью объемами фосфатного буфера); 5) 2 *М* раствор солянокислого гидроксиламина (13,9 *г* гидроксиламина растворяют в 100 *мл* дистиллированной воды). Хранят на холоду. По истечении двух недель раствор не годен к употреблению; 6) 3,5 *М* раствор едкого натра (14 *г* химически чистого едкого натра растворяют в 100 *мл* дистиллированной воды); 7) щелочной раствор гидроксиламина: перед употреблением смешивают равные объемы 2 *М* раствора гидроксиламина и 3,5 *М* раствора едкого натра; 8) соляная кислота с удельным весом 1,18, разбавленная в двух объемах воды (1 часть соляной кислоты + 2 части воды); 9) раствор хлорного железа: 10 *г* $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ в 100 *мл* 0,1н. раствора соляной кислоты; 10) 0,01%-ный водный раствор сапонина; 11) 0,1н. раствор соляной кислоты.

Т е х н и к а. В две пробирки с 0,95 *мл* 0,01%-ного раствора сапонина вносят по 0,05 *мл* крови. Одна из пробирок служит контролем. К опытной пробе добавляют 1 *мл* 0,004 *М* раствора ацетилхолинхлорида, взбалтывают в течение 10 мин. и ставят точно на 10 мин. в термостат при температуре 25°. При работе с кровью крыс и кроликов время инкубации увеличивают до 40 мин. Колебания тем-

пературы в 1—2° при 40-минутной инкубации существенно не влияют на результаты, поэтому определение холинэстеразной активности можно проводить без применения термостата, если температура в комнате удерживается в пределах 22—23°.

Одновременно с опытной пробой в термостат на 10 мин. помещают пробирку с 1 *мл* 0,004 *М* раствора ацетилхолинхлорида.

После изъятия из термостата в обе пробирки добавляют по 4 *мл* щелочного раствора гидроксиламина для прекращения действия фермента. Кровь из контрольной пробирки выливают в раствор ацетилхолинхлорида с добавленным щелочным гидроксиламином. Затем через 1—3 мин. в опытную и контрольную пробу добавляют по 2 *мл* раствора соляной кислоты и по 2 *мл* раствора хлорного железа. Через 10 мин. содержимое пробирок фильтруют и колориметрируют на ФЭК-М с зеленым светофильтром в кюветах с рабочей длиной 20 *мм* (толщиной слоя 1 *см*) против контроля на реактивы. Отсчет показаний фотоэлектроколориметра производят по левому барабану.

Контроль на реактивы готовят, приливая все реактивы в обратном порядке: 2 *мл* раствора хлорного железа, 2 *мл* раствора соляной кислоты, 4 *мл* щелочного раствора гидроксиламина, 1 *мл* 0,004 *М* раствора ацетилхолинхлорида и 1 *мл* дистиллированной воды (лимонно-желтый цвет). Для заполнения двух кювет контроль на реактивы приготовляют в двойном объеме. При длительном стоянии кювет с контролем на реактивы на стенках кювет выделяются пузырьки газа, которые значительно изменяют оптическую плотность жидкости. Во избежание этого контроль на реактивы периодически выливают из кювет и снова наполняют этим же раствором.

Расчет. Из величины оптической плотности контрольной пробы вычитают оптическую плотность опытной пробы. Полученная величина характеризует количество гидролизованного ацетилхолина, которое прямо пропорционально активности холинэстеразы.

Активность холинэстеразы выражают в микрограммах или микромолях ацетилхолина на 1 *мл* крови или сыворотки. Для расчета строят калибровочную кривую, на оси ординат которой откладывают показания ФЭК, а на оси абсцисс — микрограммы ацетилхолина. Точность метода около 10%.

Определение фосфатазы [12]

П р и н ц и п. Метод основан на определении количества фенола, освобожденного из динатрийфенилфосфата. В щелочной среде, в присутствии окислителя, фенол дает с 4-аминоантипирином красное окрашивание, которое можно определить колориметрически. Определение можно производить без удаления белка из пробы.

Р е а к т и в ы: 1) буферные растворы: а) карбонатный буфер с pH 10, 0,1 *М*: 6,36 *г* Na_2CO_3 и 3,36 *г* $NaHCO_3$ растворяют в 1000 *мл* H_2O; б) буфер с pH 4,9 : 21 *г* кристаллической лимонной кислоты растворяют в 188 *мл* н. раствора едкого натра и объем доводят до 500 *мл*.

Проверяют pH и в случае необходимости доводят до требуемого при помощи 1н. раствора едкого натра или 1н. соляной кислоты. Прибавляют несколько капель хлороформа и хранят в холодильнике; 2) субстрат: 0,01 *М* раствор динатрийфенилфосфата (2,18 *г* на 1 *л* воды). Раствор доводят до кипения, быстро охлаждают, прибавляют несколько капель хлороформа и хранят в холодильнике; 3) стандартный раствор фенола: 1 *г* кристаллического фенола растворяют в 1 *л* 0,1н. соляной кислоты. Из этого раствора разбавлением 0,1н. HCl приготовляют два рабочих стандарта, содержащих 0,01 и 0,30 *мг* фенола в 1 *мл*. Консервируют, прибавляя несколько капель хлороформа; 4) 0,5 н. раствор едкого натра; 5) 0,5 *М* $NaHCO_3$ (4,2 *г* в 100 *мл* воды); 6) 4-аминоантипирин, 0,6%-ный водный раствор; 7) железосинеродистый калий: 2,4 *г* $K_3Fe(CN)_6$ в 100 *мл* воды.

Техника. 1 *мл* буфера (pH 10 для щелочной и pH 4,9 для кислой фосфатазы) и 1 *мл* субстрата подогревают в водяной бане до температуры 37° и прибавляют 0,1 *мл* сыворотки. Для определения щелочной фосфатазы инкубируют в течение 15 мин., для определения кислой фосфатазы – 1 час. Затем прибавляют 0,8 *мл* 0,5 н. раствора едкого натра для щелочной фосфатазы (1 *мл* 0,5 н. раствора едкого натра для кислой) и 1,2 *мл* 0,5 *М* раствора $NaHCO_3$ (для кислой фосфатазы 1 *мл*). После этого прибавляют 1 *мл* 0,6%-ного 4-аминоантипирина, смешивают и прибавляют 1 *мл* 2,4%-ного железосинеродистого калия. С контрольными пробами поступают так же, с той лишь разницей, что сыворотку прибавляют после едкого натра. Так же приготовляют стандарты, причем вместо 0,1 *мл* сыворотки берут на 0,1 *мл* больше соответствующего буфера. Ставят слепую пробу со всеми реактивами, фенолом и водой. Сразу же после прибавления железосинеродистого калия возникает окрашивание, которое при хранении пробы в темноте удерживается в течение 1 часа. Интенсивность окраски измеряют при 510 *ммк*.

Расчет:

$$\text{единицы Кинг-Армстронга на 100 мл} = \frac{\text{опытная проба} - \text{контроль}}{\text{стандарт} - \text{слепая проба}} \times 0{,}01 \times$$

$$\times \frac{100}{0{,}1} = \frac{\text{опытная проба} - \text{контроль}}{\text{стандарт} - \text{слепая проба}} \times 10 \text{ (или 30)}.$$

Активность щелочной фосфатазы в норме равна 3—13 единицам, а кислой — 1—5 единицам. Точность метода порядка 8%.

Определение активности кислой фосфатазы предстательной железы в сыворотке с применением тартрата в качестве ингибитора [12а]

Принцип. Полная инактивация кислой фосфатазы наступает при конечной концентрации тартрата 0,025 *М*. Анализ следует производить в день взятия крови или в течение 24 час. при условии хранения пробы в холодильнике.

Реактивы те же, что и в предыдущей методике. Дополнительно следует приготовить 1 *М* раствор *L* (+)-винной кислоты, растворяя 15 *г* кислоты примерно в 70 *мл* воды. Затем прибавляют 18,5 *мл* 10 н. раствора едкого натра, доводят pH до 4,9 и доливают водой до 100 *мл*. Хранят в холодильнике с несколькими каплями $CHCl_3$. Аминоантипириновый реактив приготовляют, смешивая равные количества 0,6%-ного раствора 4-аминоантипирина и 0,5 *М* раствора $NaHCO_3$. Реактив устойчив при хранении в холодильнике в течение 1 месяца.

Техника. Приготовляют смеси в трех пробирках, где определяют: в пробирке *А*—общую активность, в пробирке *В* — активность после инактивации фосфатазы предстательной железы тартратом и в пробирке *С* — контроль. В каждую из пробирок отмеряют по 1 *мл* субстрата и 1 *мл* буфера. В пробирку *В* прибавляют 1 каплю тартрата. Пробирки подогревают в водяной бане до 37° (поддерживая эту t° в водяной бане) и в пробирки *А* и *В* прибавляют по 0,1 *мл* сыворотки. Инкубируют при 37° в течение 1 часа, а при высокой активности фосфатазы — 30—40 мин. Реакцию прерывают, прибавляя к каждой пробирке по 1 *мл* 0,5 н. раствора едкого натра и перемешивая содержимое. В пробирку *С* прибавляют 0,1 *мл* сыворотки, а затем во все пробирки по 2 *мл* аминоантипиринового реактива и 1 *мл* железосинеродистого калия. Приготовляют стандартную пробу, содержащую 1,1 *мл* буфера, 1 *мл* фенолового стандарта (0,01 *мг/мл*), 1 *мл* 0,5н. раствора едкого натра, 2 *мл* аминоантипиринового реактива и 1 *мл* железосинеродистого калия. Слепую пробу приготовляют таким же образом, как и стандартную, с той разницей, что вместо фенола берут воду. Интенсивность окраски измеряют при 510 *ммк*.

Расчет: общая активность кислой фосфатазы в единицах Кинг-Армстронга на 100 *мл*:

$$\frac{A - C}{\text{стандарт} - \text{слепая проба}} \times 10,$$

где *А* — оптическая плотность раствора из пробирки *А*, *С* — из пробирки *С*, «стандарт» — стандартного раствора, «слепая проба» — слепой пробы.

Фосфатаза, инактивированная тартратом, в единицах, как выше:

$$\frac{A - B}{\text{стандарт} - \text{слепая проба}} \times 10$$

(*В* — оптическая плотность раствора из пробирки *В*)

В эту методику можно также включить определение активности кислой фосфатазы, устойчивой к формальдегиду. Для этого приготовляют пробу *D*, как и пробу *А*, но с прибавлением 1 *мл* нейтрализованного формальдегида, pH которого предварительно доводят до 4,9. Активность кислой фосфатазы, устойчивой

к формальдегиду,

$$\frac{D - C}{\text{стандарт} - \text{слепая проба}} \times 10$$

(D — оптическая плотность раствора из пробирки D).

Общая активность кислой фосфатазы в среднем равна 1,88 ед. (1,0—4,0), фосфатазы, инактивированной тартратом, — 0,335 ед. (0—0,8), а устойчивой к формальдегиду — 1,0 (0,5—1,8). Авторы предлагают считать верхней границей нормы для кислой фосфатазы, инактивированной тартратом, 0,7 ед.

Точность метода 5%. Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

Определение кислой фосфатазы [13]

(КФ 3.1.3.2)

Кирк и соавторы [13] предложили модификацию метода определения кислой фосфатазы, отличающуюся быстротой выполнения.

Сначала готовят буферный раствор. Для этого в мерную колбочку емкостью 100 *мл* наливают около 50 *мл* воды, в которой растворяют 1,225 *г* кислого фталата калия (мол. вес 204). При помощи 0,1 н. раствора едкого натра pH раствора доводят точно до 5,0 и доливают водой до метки.

1 *мл* этого раствора отмеряют в реакционную колбочку емкостью 15—20 *мл*. Сюда же отвешивают 0,72 *г* субстрата (фенолфталеинфосфорной кислоты; мол. вес 480), растворение которого ускоряют вращением колбочки. Приготовленный раствор годен в течение трех недель, если его хранить в холодильнике при 4°.

Если анализируют свежевыделенную простатную жидкость (которую получают, слегка массируя железу в продольном направлении от ее верхнего края к нижней части), собранную на часовое стекло, то сначала готовят разбавленный раствор ее (разведение 1 : 1000; при пониженной активности берут разведение 1 : 200). Для этого 0,01 *мл* жидкости отмеряют в пробирку, содержащую 10 *мл* буферного раствора кислого фталата калия (см. выше). Для анализа берут 0,5 *мл* этого разбавленного раствора, отмеряя жидкость в реакционную колбочку, содержащую раствор субстрата в 1 *мл* буфера и взятую из холодильника (после чего быстро «согревают» под струей воды из крана).

Содержимое колбочки быстро размешивают, оставляют при 25° в течение 2 мин. (точно!) и прекращают ферментативную реакцию, приливая в колбочку 8,5 *мл* карбонатно-бикарбонатного буферного раствора (1,630 *г* карбоната натрия и 0,386 *г* бикарбоната натрия в 100 *мл*, pH 10,4) Освобождающийся при этом фенолфталеин окрашивает раствор в красный цвет. Необходимо при этом отметить температуру раствора (реакция должна протекать при 25°) [1].

[1] Если температура комнаты выходит за пределы 24—26°, то реакцию ведут в термостате при 25° или вносят поправку (см. ниже).

Колориметрируют в течение 15 мин. (не позднее чем через 1 час) в колориметре типа Дюбоска против стандартного раствора; расчет — по правилам колориметрии.

Авторы [13] рекомендуют готовить стандартные растворы путем разведения 1 *мл* 0,5%-ного спиртового раствора фенолфталеина соответствующим объемом (от 2 до 20 *мл*) карбонатно-бикарбонатного буфера. Рекомендуется иметь набор таких стандартных разведений (окраска которых стабильна) в диапазоне от 1000 до 18 000 так называемых единиц Гутмана [1].

Если имеется спектрофотометр типа Бекмана, то ведут отсчет при 550 *ммк* (против 96%-ного алкоголя во второй кювете). Расчет ведут по формуле:

$$\text{активность кислой фосфатазы в единицах Гутмана} = (a - 0{,}150)\cdot 8{,}683 \cdot 1{,}850,$$

где a — найденная величина оптической плотности.

В расчет вносят поправку на пустой опыт, величину которой устанавливают, заменяя анализируемую простатную жидкость таким же объемом (0,5) *мл* буферного раствора кислого фталата натрия.

Если температура анализируемой смеси отличается от 25° больше чем на 0,5°, то для приведения результата анализа к активности фермента при 25° рекомендуется пользоваться следующими данными.

°C	Фактор	°C	Фактор	°C	Фактор
20	1,59	24	1,09	28	0,805
21	1,43	25	1,00	29	0,750
22	1,30	26	0,925	30	0,705
23	1,19	27	0,865		

Ошибка метода (при точном соблюдении условий опыта) не превышает 3%. Преимущество его — быстрота выполнения (10 мин. вместо 45, требующихся для анализа по методу, использующему фенилфосфат натрия).

Определение кислой и щелочной фосфатаз [14]

(кислая — КФ 3.1.3.2; щелочная — КФ 3.1.3.1)

П р и н ц и п. Сыворотка инкубируется с β-глицерофосфатом в течение 1 часа при 37°, pH 5,0 для кислой фосфатазы и pH 9,7 для щелочной. Определяется неорганический фосфор в сыворотке до и после инкубации; разница — это количество фосфора, высвобожденного из глицерофосфата в результате ферментативного действия. Фосфор определяется по Фиске — Суббароу [2].

---

[1] Средняя активность кислой фосфатазы на 1 *мл* простатной жидкости здоровых взрослых людей (18—40 лет) составляет 8000—14 000 единиц.

[2] В. С. А с а т и а н и. Биохимическая фотометрия. М. Изд-во АН СССР, 1957, стр. 654.

Реактивы: 1) основной раствор забуференного субстрата для кислой фосфатазы. В колбу емкостью 250 *мл* отмеряют 3 *мл* петролейного эфира и около 200 *мл* воды, добавляют 2,5 *г* β-глицерофосфата натрия и 2,13 *г* диэтилбарбитурата натрия, растворяют, доводят дистиллированной водой до метки, перемешивают. Раствор можно хранить около 3 месяцев в холодильнике; 2) рабочий раствор кислого субстрата: в мерную колбу емкостью 100 *мл* отмеряют 3 *мл* петролейного эфира, 50 *мл* основного раствора субстрата и 5,0 *мл* 1н. раствора уксусной кислоты (ледяную уксусную кислоту разбавляют водой 1 : 17,5), доводят водой до метки и перемешивают; pH должен быть 5,0 (проверяют индикаторной бумагой). Раствор постепенно гидролизуется, но при хранении в холодильнике годен около 2 недель; 3) основной раствор забуференного субстрата для щелочной фосфатазы: в колбу емкостью 250 *мл* отмеряют 3 *мл* петролейного эфира и 200 *мл* воды. Добавляют 2,5 *г* β-глицерофосфата натрия и 4,25 *г* диэтилбарбитурата натрия; растворяют, доводят водой до метки, перемешивают. Реактив годен в течение 3 месяцев, если хранить в холодильнике; 4) рабочий щелочной раствор субстрата: в колбу емкостью 100 *мл* вносят 3 *мл* петролейного эфира, 50 *мл* основного раствора (3) и 2,9 *мл* 0,10 н. NaOH, доводят до метки водой и перемешивают. Проверяют pH на pH-метре. Если pH отличается от 10,8 больше чем на 0,1, его доводят до нормы добавлением 0,1 н. раствора NaOH или HCl. Хранят в холодильнике. Раствор пригоден в течение 2 недель. Реактивы для определения неорганического фосфора см. сноску[2] на стр. 500.

Техника: а) кислая фосфатаза: в пробирки наливают 4,5 *мл* рабочего кислого субстрата, ставят в водяную баню при 37° приблизительно на 2 мин.; б) щелочная фосфатаза: в пробирку помещают 4,5 *мл* рабочего щелочного раствора, ставят на 2 мин. в водяную баню при 37°. Добавляют 0,5 *мл* сыворотки, перемешивают и вновь ставят в водяную баню при 37° ровно на 1 час.

Пока эта смесь инкубируется, готовят смеси: во второй пробирке — 0,5 *мл* сыворотки + 4,5 *мл* воды (неорганический P сыворотки), в третьей пробирке — 4,5 *мл* соответствующего субстрата + +0,5 *мл* воды (холостой опыт на субстрат).

После 1 часа инкубации пробирку с реакционной смесью вынимают из бани и во все пробирки добавляют 1,0 *мл* 30%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, перемешивают, дают отстояться 5 мин. и центрифугируют.

Для цветной реакции берут: 1) холостой опыт на реактивы: 0,33 *мл* 30%-ного раствора ТХУ + 1,67 *мл* воды (*x*); 2) стандарт: 2,0 *мл* рабочего стандартного раствора фосфата (20 *мкг* P) (C); 3) холостой опыт на субстрат: 2,0 *мл* смеси из третьей пробирки (*Cx*); 4) неорганический P : 2,0 *мл* надосадочной жидкости из второй пробирки (НР); 5) фосфатаза: 2,0 *мл* надосадочной жидкости из пробирки с реакционной смесью (Ф).

В каждую пробирку добавляют 0,4 *мл* молибденового реактива

(см. сноску[2] на стр. 500), перемешивают, затем добавляют 4,0 *мл* Р-семидинового реактива [1].

Через 10 мин. колориметрируют против воды при 770 *ммк* или с фильтром, имеющим номинальную длину волны в этой области (660 *ммк*).

Окраска стабильна в течение 1,5 часа.

Расчет:

$$\textit{мг}\ \text{неорганического Р/100}\ \textit{мл} = \frac{A_{HP} - A_X}{A_C - A_X} \times 0{,}02 \times \frac{100}{0{,}167} = \frac{A_{HP} - A_X}{A_C - A_X} \times 12,$$

где A — оптическая плотность.

$$\text{Единицы Шиновара} = \frac{A_Ф - A_{CX}}{A_C - A_B} \times 12 — \textit{мг}\ \text{неорганического Р/100}\ \textit{мл}.$$

Если $\left(\frac{A_Ф - A_{CX}}{A_C - A_X} \times 12\right)$ получается больше 45, опыт повторяют с меньшим объемом сыворотки.

Замечания

1. В эритроцитах активность кислой фосфатазы в 100 раз выше по сравнению с сывороткой; поэтому незначительный гемолиз вызывает существенные ошибки при определении активности кислой фосфатазы. Для щелочной фосфатазы такой гемолиз можно не принимать во внимание.

2. ТХУ и β-глицерофосфат в данной методике не влияют на окраску, тогда как в других методах эти реактивы уменьшают интенсивность окраски.

3. pH для кислой фосфатазы между 4 и 6, так что малое отклонение от pH 5 не дает значительных изменений. Оптимум pH для щелочной фосфатазы при 37° равен 9,7.

4. Установлено, что фосфор в количестве, эквивалентном 10% глицерофосфата, вызывает отклонение ферментативной реакции от прямолинейности. 10% фосфора субстрата в исследуемой реакционной смеси — 225 *мкг*. Это эквивалентно 40 *мг*/100 *мл* содержанию Р в сыворотке. Исходя из этого, если в опыте получается значение Р выше 45, опыт нужно проводить заново с меньшим объемом сыворотки.

5. Устойчивость проб. Кислая фосфатаза сыворотки стабильна в замороженном виде в течение 3 месяцев, а при хранении в холодильнике — около 14 дней. При комнатной температуре сыворотка, отделяясь от сгустка, значительно инактивируется в течение 1 часа. Это является результатом повышения pH сыворотки, что обуслов-

---

[1] Готовят, смачивая 50 *мг* хлористого N-фенил-пара-фенилендиамина 5 каплями 95%-ного этанола, растворяя его при встряхивании в 50 *мл* 1%-ного раствора дисульфита натрия и доливая его тем же раствором до 100 *мл*. При хранении в холодильнике раствор не портится в течение 1 месяца. См. также [15].

лено выделением CO_2, степень инактивации зависит от объема воздуха над реакционной смесью в пробирке. Если сыворотку не отделять от сгустка, то ее pH не меняется и, следовательно, не меняется активность фермента в течение 24 час. при комнатной температуре.

В моче кислая фосфатаза устойчива в течение 7 дней при комнатной температуре и 15 дней — при хранении в холодильнике, но инактивируется за 2 дня в замороженном виде.

Сывороточная щелочная фосфатаза стабильна в течение 16 месяцев в замороженном состоянии. При комнатной температуре и при хранении в холодильнике за первые 24 часа активность повышается от 5 до 30%, после чего происходит падение активности в течение нескольких дней.

Точность метода 5%; процент ошибки больше, если активность ниже нормы.

Норма: кислая фосфатаза — от 0 до 1,1 ед.; щелочная фосфатаза — от 2 до 9 ед.

Определение фосфатаз находит широкое применение в пищевой химии, главным образом для анализа молока и молочных продуктов. Так как продолжительное нагревание инактивирует фосфатазы, то определение фосфатазной активности может быть использовано для установления степени кипячения, которому было подвергнуто молоко. Определение фосфатазной активности описанными выше методами может быть использовано для исследования таких молочных продуктов, как сыр или масло [1].

Определение глюкозо-6-фосфатазы [16]
(КФ 3.1.3.9)

П р и н ц и п. Глюкозо-6-фосфатаза катализирует реакцию

$$\text{Глюкозо-6-фосфат} + H_2O \rightarrow \text{глюкоза} + \text{фосфат}$$

Скорость реакции измеряется по увеличению количества неорганического фосфата; это увеличение временного характера. Глюкозо-6-фосфатаза имеет широкий оптимум pH между 6,0 и 7,0. Обычно активность фермента измеряют при pH, равном 6,5, источники ошибок исключаются при помощи щелочной фосфатазы. В опытной пробе концентрация субстрата должна быть минимум 0,03 *M*.

Р е а к т и в ы: 1) буфер. Несколько буферов было предложено для определения глюкозо-6-фосфатазы, среди них цитратный, какодилатный, малатный и гистидиновый. Первые два буфера употребляют чаще всего, они кажутся одинаково надежными: а) цитратный буфер (0,1 *M* раствор; pH 6,5): 2,101 *г* лимонной кислоты ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) растворяют в 50—75 *мл* дистиллированной воды, значение pH доводят до 6,5 при помощи 30%-ного раствора (в/о) NaOH

---
[1] Предложены также специальные методы определения фосфатазной активности в сливках и масле (Zocchi S., Igiene mod., 1954, 47, 441) или в сыре (Schormüller J. u. Lahmann E., Z. Lebensmitt. Unters. Forsch., 1956, 103, 211).

или KOH и дополняют до 100 *мл* водой; б) какодилатный буфер (0,1 *М* раствор, pH 6,5) : 2,14 *г* какодилата натрия ($Na(CH_3)_2AsO_2 \cdot 3H_2O$) растворяют в 50 *мл* дистиллированной воды до 75 *мл*, значение pH доводят до 6,5 при помощи 5 н. HCl и дополняют до 100 *мл* водой; 2) глюкозо-6-фосфат (0,08 *М* раствор Г-6-Ф) : 417 *мг* бариевой соли глюкозо-6-фосфата ($C_6H_{11}O_9PBa \cdot 7H_2O$) суспендируют в 2—3 *мл* дистиллированной воды. Добавляют столько 1н. раствора HCl, чтобы соль растворилась. Затем добавляют 114 *мг* Na_2SO_4 или 139 *мг* K_2SO_4. Основательно смешивают, центрифугируют, осадок $BaSO_4$ отбрасывают. К надосадочной жидкости добавляют осторожно каплю раствора Na_2SO_4. Осадок не должен образоваться. Значение pH доводят до 6,5 30%-ным (в/о) раствором NaOH или KOH, разбавляют дистиллированной водой до 10 *мл*; 3) трихлоруксусная кислота (10% в/о) : 10 *г* трихлоруксусной кислоты растворяют в дистиллированной воде, объем доводят до 100 *мл*; 4) молибдат аммония (приблизительно $2 \cdot 10^{-3}$ *М* раствор): 2,5 *г* молибдата аммония ($(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$) растворяют в 50 *мл* дистиллированной воды. 14 *мл* концентрированной серной кислоты осторожно добавляют к 200 *мл* дистиллированной воды. Разбавленную кислоту наливают в раствор молибдата и доливают дистиллированной водой до 1000 *мл*; 5) восстанавливающий раствор (приблизительно $4,2 \cdot 10^{-2}$ *М* амино-2-нафтол-4-сульфоновая кислота; приблизительно 0,56 *М* SO_3^{2-}) : 5,7 *г* $NaHSO_3$ и 0,2 *г* Na_2SO_3 растворяют в 50 *мл* дистиллированной воды. В полученной жидкости растворяют 0,1 *г* 1-амино-2-нафтол-4-сульфоновой кислоты и доливают дистиллированной водой до 100 *мл*; 6) стандартный раствор фосфата ($5 \cdot 10^{-4}$ *М* KH_2PO_4) : 68 *мг* однозамещенного фосфата растворяют в 20 *мл* дистиллированной воды, добавляют 10 *мл* концентрированной серной кислоты и разбавляют дистиллированной водой до 1000 *мл*.

Цитратный буфер после добавления толуола можно хранить при 4° минимум две недели. Раствор глюкозо-6-фосфата разливают в несколько пробирок, каждая из них содержит нужное количество для одного дня работы и хранят замороженными. Раствор хранят при температуре 0—4°. Растворы трихлоруксусной кислоты, молибдата и фосфата при комнатной температуре сохраняются неограниченно долго. Восстанавливающий раствор хранят в темноте при комнатной температуре в маленьких, доверху наполненных бутылках. Содержимое открытой бутылки употребляют не дольше, чем в течение одной недели.

Т е х н и к а. Печень и почки тотчас после экстирпации охлаждают, 250 *г* ткани гомогенизируют с 9,75 *мл* буфера (раствор 1*а* или 1*б*) в гомогенизаторе и фильтруют через марлю. Гомогенат содержит 2,5 *мг* печени/0,1 *мл*. Гомогенаты можно хранить минимум 1 час на льду. По 0,1 *мл* раствора глюкозо-6-фосфата и буфера (раствор 1*а* или 1*б*) помещают в двух пробирках на водяной бане 37°. На каждую пробу ставят одну контрольную пробу 1, а на каждую серию — одну контрольную пробу 2 (см. ниже). В центрифужные пробирки отмеривают:

Опытная проба	Контрольная проба 1	Контрольная проба 2
0,1 *мл* отфильтрованного гомогената, ставят на водяную баню при 37° и через 5 мин. добавляют 0,1 *мл* раствора глюкозо-6-фосфата	0,1 *мл* отфильтрованного гомогената, приблизительно 0,1 *мл* буфера	0,1 *мл* буфера (1), 0,1 *мл* раствора глюкозо-6-фосфата

Содержимое пробирок перемешивают, отмечают время каждого добавления. Каждую пробу оставляют при 37° на 15 мин. (точное время). Затем во все пробирки добавляют по 2 *мл* раствора трихлоруксусной кислоты, центрифугируют. Прозрачная надосадочная жидкость (1 *мл*) употребляется для определения фосфата. Содержание фосфата в надосадочной жидкости определяется колориметрически. Измеряемое излучение 660 или 700 *ммк*. В пробирку отмеривают:

Опытная и контрольная пробы	Стандартная проба
5 *мл* раствора молибдата, 1 *мл* надосадочной жидкости	5 *мл* раствора молибдата, 1 *мл* раствора фосфата

Затем в каждую пробирку добавляют по 1 *мл* восстанавливающего раствора, перемешивают и отмечают время. Восстанавливающий раствор добавляют через промежутки времени, необходимые для колориметрического измерения в дальнейшем. Каждую пробу оставляют при комнатной температуре в течение 15, максимум 60 мин. (для каждой пробы должны оставлять одинаковое время между добавлением восстанавливающего раствора и колориметрическим определением) и промеряют экстинкцию при 660 или 700 *ммк*.

Вычисление:

$$\frac{E_V - E_{K_1}}{E_S} \cdot [P] \cdot 2{,}2 =$$ **мкмолям** свободного фосфата/проба ферментативной реакции.

где E_V — экстинкция раствора опытной пробы; E_{K_1} — экстинкция раствора контрольной пробы 1; E_S — экстинкция стандартной пробы; [P] — *мкмоли* фосфата в стандартной пробе (здесь: 0,5 *мкмолей*); 2,2 — объем пробы для ферментативной реакции после добавления раствора трихлоруксусной кислоты (*мл*). Для пересчета на микромоли фосфата/мин·*г* ткани следует умножить на $\frac{1000}{15 \cdot 2{,}5}$, где 15 — время рабочего хода ферментативной реакции (мин.), 2,5 — *мг* ткани в пробе для ферментативной реакции, 1000 — пересчет с *мг* на *г*.

Пример: в описанных условиях с пробой печени во время определения фосфата измеряют следующее значение:

$$E_V = 0{,}277; \qquad E_{K_1} = 0{,}030; \qquad E_S = 0{,}385.$$

Стандартная проба содержит 0,500 *мкмоля* фосфата. Отсюда вычисляют $\frac{0{,}277 - 0{,}030}{0{,}385} \cdot 0{,}5 \cdot 2{,}2 = 0{,}705$ *мкмоля* фосфата в пробе, взятой для ферментативной реакции $= 0{,}705$ *мкмоля* фосфата (15 мин. в 2,5 *мг*

печени $= 0,705 \cdot \frac{1000}{15 \cdot 2,5} = 18,8$ *мкмоля* фосфата (мин.) в 1 *г* печени. Нормальное значение для крысы лежит между 13 и 15 *мкмолями* фосфата (мин.) в 1 *г* печени.

Гомогенат печени можно хранить 4 часа на ледяной бане без потери активности. Продолжительное хранение при 0 — 4° приводит к потери активности.

Однократное замораживание на вредит ферменту. Повторное замораживание и оттаивание разрушают его активность. Сразу же после экстирпации печень, замороженную при — 18°, можно хранить больше месяца без уменьшения активности глюкозо-6-фосфатазы. Это обстоятельство следует учитывать и для гомогенатов, которые замораживают сразу же после приготовления.

Источники ошибок. Гидролиз глюкозо-6-фосфата катализируют также неспецифические фосфатазы. Важнейшая из них щелочная фосфатаза кишок, оптимум pH которой лежит между 9 и 10, но фермент активен также и при pH 6,5. Щелочная фосфатаза, в противоположность глюкозо-6-фосфатазе, активируется ионами магния. Глюкозо-6-фосфатаза тормозится молибдатом, фторидом и арсенитом. Бериллий ингибирует многие другие фосфатазы, но не тормозит глюкозо-6-фосфатазу. Активирование при помощи магния, торможение при помощи бериллия и величина оптимума pH могут служить для того, чтобы различить глюкозо-6-фосфатазу от других фосфатаз.

Детергенты и различные поверхностно-активные вещества быстро инактивируют глюкозо-6-фосфатазу. Их влияние зависит от концентрации. Малые количества инактивируют не очень сильно, высокие концентрации тормозят фермент полностью. Пятнадцатиминутная инкубация фермента при pH 5 и 37° сразу же разрушает его активность. Точность метода 5 —6%.

Определение глюкозо-6-фосфатазы [17] [1]

Принцип. Метод основан на определении неорганического фосфора, освобождающегося при ферментативном гидролизе глюкозо-6-фосфата. Активность фермента выражают в микромолях фосфора, освободившегося за час при 37° из 1 *мл* сыворотки крови.

Реактивы: 1) веронал-ацетатный буферный раствор с pH 6,5; 2) 0,01 *М* раствор глюкозо-6-фосфата. Готовят из бариевой соли на буферном растворе с pH 6,5; 3) 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты; 4) те же реактивы, что и для определения фосфора по методу Фиске—Суббароу.

Техника. В пробирку с 0,5 *мл* веронал-ацетатного буферного раствора вносят 0,2 *мл* сыворотки крови и 0,3 *мл* 0,01 *М* раствора глюкозо-6-фосфата. Смесь инкубируют при 37° в течение часа. В конце инкубации прибавляют для осаждения белков 1 *мл* 10%-ного

[1] Данная модификация разработана для сыворотки крови.

раствора трихлоруксусной кислоты. Пробирку встряхивают и помещают на несколько минут в лед, а затем центрифугируют.

1 *мл* полученного центрифугата вносят в чистую пробирку и определяют содержание неорганического фосфора по методу Фиске—Суббароу. Одновременно ставят контрольную пробу, в которую глюкозо-6-фосфат добавляют перед осаждением белков в конце инкубации.

Расчет. Содержание неорганического фосфора в 1 *мл* центрифугата вычисляют по калибровочной кривой (см. сноску[2] на стр. 500). Ферментную активность сыворотки крови рассчитывают по разности между опытной и контрольной пробой. Активность фермента выражают в микромолях фосфора, освободившегося за час при 37° из 1 *мл* сыворотки крови.

Определение аденозинтрифосфатазной активности миозина [18]

(АТФ-аза, КФ 3.6.1.3)

П р и н ц и п. О расщеплении АТФ под влиянием миозина можно судить по нарастанию неорганической фосфорной кислоты и убыли АТФ при инкубации ее с очищенными препаратами миозина. Аденозинтрифосфатазная активность миозина резко увеличивается в присутствии ионов кальция.

Р е а к т и в ы: см. ниже, Техника.

Т е х н и к а. При постановке опыта параллельно пробам с активным миозином всегда ставят пробы с инактивированным раствором миозина. Инактивация проводится нагреванием раствора миозина в кипящей водяной бане в течение 15 мин.

Опыт ставят по следующей схеме (указаны количества в *мл*):

№ пробы	Раствор АТФ (содержащий 0,2 *мг* легко гидролизуемого P в 1 *мл*)	Активный раствор миозина	Инактивированный раствор миозина	Боратный буферный раствор: (pH 8,6)	Раствор $CaCl_2$ (0,03 *M*)
1	1,0	1,0	—	1,0	0,5
2	1,0	—	—	1,0	0,5
3	1,0	—	1,0	1,0	0,5
4	1,0	—	1,0	1,0	0,5
5					

В пробы № 1 и 3 перед добавлением раствора миозина приливают по 0,5 *мл* 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Пробы № 2 и 4 закрывают пробками и ставят на 2 часа в термостат при 37°. После инкубации пробы вынимают из термостата и добавляют к ним по 0,5 *мл* раствора трихлоруксусной кислоты, перемешивают и через 15 мин. центрифугируют. В безбелковом центрифугате проводят определение неорганического фосфора и АТФ. Разность количеств

неорганического фосфора и АТФ в пробах с активным миозином до и после инкубации определяет активность препарата миозина. Разность количеств неорганического фосфора и АТФ в пробах с инактивированным раствором миозина дает представление о спонтанном расщеплении АТФ в условиях опыта.

Активность миозина иногда выражают коэффициентом Q_p, предложенным В. А. Энгельгардтом [18] и представляющим количество *о*-фосфата, отщепляющегося от АТФ при воздействии 1 *мг* белка ферментного препарата.

Количество *о*-фосфата условно выражают в кубических миллилитрах эквимолекулярного количества газа, пересчитанного на 1 час инкубации.

Так, например, при воздействии 1 *мл* раствора миозина на раствор АТФ в течение 10 мин. нарастание количества *о*-фосфата было найдено равным 0,03 *мг*. Содержание азота в 1 *мл* ферментного препарата составляло 0,05 *мг*. Следовательно, Q_p будет равно

$$\frac{30\cdot(20,4/31)\cdot 60}{0,05\cdot 6,25\cdot 10}\ \text{мг},$$

где 30 — прирост количества ортофосфата за 10 мин. в *мкг*; 20,4/31— коэффициент для пересчета 1 *мкг* фосфора на 1 $мм^3$ газа; 60 — время в мин., условно выбранное для расчета; 0,05 — миллиграммы азота на 1 *мл* раствора фермента; 6,25—коэффициент для пересчета азота на белок; 10 — время инкубации в мин.

Метод получил широкое распространение.

Определение фенолсульфатазы [37]

(Арилсульфатаза; АФ 3.1.6.1)

Принцип. Мерой активности фермента служит интенсивность окраски, вызванной освобождением индикатора из субстрата (*п*-нитрофенилсульфата).

Реактивы: см. ниже, Техника.

Техника. В пробирку, содержащую 3 *мл* ацетатного буфера (рН 5,8), прибавляют 1 *мл* раствора фермента и кристаллик тимола. Раствор фермента готовят из навески свежевырезанной ткани, которую гомогенизируют в стеклянном гомогенизаторе в течение 2—3 мин. с 5 *мл* ледяной воды, после чего центрифугируют и центрифугат берут в опыт (или замораживают до проведения анализа).

Пробирку погружают в водяной термостат при 37° и спустя 5 мин., отмеряют в нее 1 *мл* субстрата (растворяют 0,1285 *г* *п*-нитрофенилсульфата калия в воде, затем доливают водой 100 *мл*), слегка вращают пробирку, закупоривают пробкой и инкубируют точно 10 час., после чего в пробирки, включая контрольные, отмеряют по 5 *мл* 1н. раствора едкого натра. В контрольные пробирки затем добавляют по 1 *мл* субстрата.

Содержимое пробирок несколько раз перемешивают, переворачивая пробирки, и ведут отсчет в фотоэлектрическом колориметре

(светофильтр на 420 *ммк*), установив гальванометр на 100% пропускания по воде.

Содержание *п*-нитрофенилсульфата, как обычно, находят по стандартной кривой (построенной по результатам анализа серии стандартных растворов), вычитая из отсчета главного опыта отсчет контроля, получают количество индикатора в микрограммах, служащее мерой активности фермента.

За единицу фенолсульфатазы принимают количество фермента, обусловливающее в опыте интенсивность окраски, эквивалентную 10 *мкг* *п*-нитрофенилсульфата.

Известны и другие модификации колориметрического и спектрофотометрического методов определения сульфатаз. Так, описан [38] колориметрический метод, основанный на определении 4-нитрокатехина, освобождающегося при ферментативном гидролизе субстрата (сульфата нитрокатехина). При этом активность сульфатазы А определяют при pH 5,0 и концентрации субстрата 0,03 *М* тогда как определение сульфатазы В ведут при pH 5,9 и концентрации того же субстрата 0,06 *М*.

Спектрофотометрический метод [39] основан на измерении изменения экстинкции, обусловленного *п*-нитрофенолом, освобождающимся при действии фермента на субстрат (*п*-нитрофенилсульфат).

Аналогичный метод, разработанный несколько ранее в лаборатории Глика [40] для ультрамикроопределения фенолсульфатазы в навесках ткани около нескольких микрограммов, страдал тем недостатком, что не была указана необходимость холостого опыта (без исследуемой ткани). В дальнейшем метод был улучшен Гликом [41]. Основные этапы метода заключаются в следующем. Навеску ткани (несколько микрограммов) смешивают с 5 *мкл* воды в пробирке, спустя 30 мин. прибавляют субстрат в буферном растворе (2 объема 0,005 *М* раствора *п*-нитрофенилсульфата калия смешивают с 3 объемами 0,5 н. ацетатного буфера pH 5,8) и инкубируют, закупорив пробирку, от 1 до 36 час. в зависимости от природы исследуемого материала.

После этого в пробирку добавляют 20 *мкл* 0,5н. раствора едкого натра в 50%-ном спирте, центрифугируют в течение 5 мин. на большой скорости (20 000 g) и берут аликвотную часть центрифугата для спектрофотометрического измерения при 400 *ммк*. В расчет вносят поправку на основании двух холостых опытов: а) без ткани и б) без субстрата. Активность фенолсульфатазы выражают в миллимикрограммах *п*-нитрофенола, освобожденного в результате ферментативного гидролиза в течение 1 часа.

Рэтенбург и Зелигмэн [42] рекомендуют в качестве субстрата 6-бензоил-2-нафтилсульфат калия. Освобождающийся в результате ферментативного гидролиза 6-бензоил-2-нафтол дает с тетраазотированным диортоанизидином синюю окраску, используемую для определения на фотоэлектрическом колориметре при длине волны 540 *ммк*.

Определение рибонуклеазы [43]
(КФ 2.7.7.16)

Спектрофотометрический метод

Принцип. При воздействии рибонуклеазы на рибонуклеиновую кислоту экстинкция раствора РНК уменьшается при 300 *ммк*.

Реактивы (все растворы приготовляются на бидистиллированной (в кварцевой посуде) воде: 1) ацетатный буфер (0,1 *M*, pH 5,0): 70,5 объемных частей 0,1 *M* раствора ацетата натрия (8,2 *г/л*) смешивают с 29,5 объемными частями 0,1н. раствора уксусной кислоты (5,7 *мл* ледяной уксусной кислоты/*л*); 2) ацетатный буфер (0,2 *M*; pH 3,7): одну объемную часть 0,2 *M* раствора ацетата натрия (16,4 *г/л*) смешивают с 9 частями 0,2 н. раствора уксусной кислоты (11,5 *мл* ледяной уксусной кислоты/*л*); 3) рибонуклеат (0,1% в/о): 0,1 *г* рибонуклеата натрия растворяют в 100 *мл* 0,1 *M* ацетатного буфера (1); 4) рибонуклеаза—РНК-аза (50 *мкг* белка на 1 *мл*): 5 *мг* кристаллической рибонуклеазы поджелудочной железы растворяют в 100 *мл* воды. Все растворы хранятся закрытыми в холодильнике при 2—4°. Раствор субстрата после добавления крупинки тимола может сохраняться в холодильнике почти два месяца.

Техника. Перед определением разрушают неспецифические фосфатазы нагреванием в кислой среде (pH 3,7). Для этой цели исследуемый материал (сыворотка, секреты, моча) смешивают с равными частями ацетатного буфера (2) и ставят на 10 мин. на кипящую водяную баню. Осадок отделяют центрифугированием.

Постановка опыта. Измерение экстинкции проводят при 300 *ммк*; толщина слоя 1 *см*, объем 2 *мл*; комнатная температура, постоянная в течение одной опытной серии или для сравнительного измерения. Перед началом измерения поддерживают равномерную температуру всех растворов (водяная баня); для измерения при более высоких температурах употребляют специальные приспособления для поддержания в кюветах постоянной температуры; экстинкцию измеряют против сравнительной кюветы с водой. В кювету последовательно отмеряют пипеткой: 2 *мл* раствора рибонуклеата, 2 *мл* пробы, быстро перемешивают, включают секундомер и в течение 10 сек. отсчитывают начальную экстинкцию (E_0). Через 15, 30 и 60 сек. и дальше каждую минуту отсчитывают экстинкцию E_t до 10 мин. Для каждого препарата рибонуклеата в больших интервалах времени отсчитывают и в дальнейшем экстинкцию, до прекращения реакции (от 1 до 3 час). Отсчитывают конечное значение экстинкции E^f.

Вычисление. Скорость реакции дана по формуле

$$-\frac{dE}{dt} = K \cdot C \cdot (E_t - E_f), \qquad (1)$$

где C — концентрация рибонуклеазы, K — константа скорости. В каждый момент скорость пропорциональна количеству еще нерасщепленного субстрата. Это соответствует разнице экстинкции E_t —

— E_f. (E_t-экстинкция за время t; E_f-экстинкция после окончания реакции).

Интегрирование уравнения (1) дает:

$$-\log (E_t - E_f) = \frac{K \cdot C}{2,3} \cdot t - \log (E_0 - E_f). \qquad (2)$$

Это уравнение прямой в системе координат с $\log (E_t - E_f)$ — ордината и t — абсцисса. Наклон прямой — $\frac{K \cdot C}{2,3}$, ее отрезок на ординате: $\log (E_t - E_f)$. Значение для E_0 вычисляется из уравнения (2), но эту величину можно получить и экстраполяцией (см. [43], стр. 39) уменьшения экстинкции против времени $t \to 0$. K — мера для специфической активности рибонуклеазы, отнесенной к концентрации фермента в опытной пробе (*ед/мг* ферментного белка в опытной смеси); $K \cdot C$ — активность фермента. Куниц [44] определяет как единицу активности то количество фермента в 1 *мл*, которое в определенных условиях (0,05% рибонуклеата в 0,05 *М* растворе натрийацетатного буфера, pH 5,0, 25°) при 300 *ммк* уменьшает экстинкцию за 1 мин. от E_0 до E.

Единицу активности на 1 *мл* смеси по этому определению измеряют соответственно уравнению (1):

$$K \cdot C = -\frac{dE}{dt} \cdot \frac{1}{E_0 - E_f} \approx -\frac{\Delta E}{\Delta t} \cdot \frac{1}{E_0 - E_f}. \qquad (3)$$

Вычисление активности фермента. Экстинкцию E_t наносят против соответствующего времени ($t_{мин}$). Приблизительно линейную начальную часть кривой используют для вычисления

$$-\frac{dE}{dt} \approx \frac{\Delta E}{\Delta t}.$$

E_0 вычисляют при помощи экстраполяции против $t = 0$. Эти значения и E_f вставляют в уравнение (3) (см. ниже, пример).

Если кривая в начале изгибается сильнее, то следует получить несколько значений $\log (E_t - E_f)$ и по уравнению (2) вычислить $K \cdot C$ (сравни пример).

Пример. Раствор рибонуклеазы содержит 2,5 *мкг* белка в 1 *мл*. Протокол опыта:

Время после начала опыта, мин.	E_t	$E_t - E_f$	$\log (E_t - E_f)$
1	0,500	0,159	0,2014—1
2	0,490	0,149	0,1732—1
3	0,479	0,138	0,1399—1
4	0,468	0,127	0,1039—1
7	0,445	0,104	0,0170—1
10	0,430	0,089	
120	0,343		
180	0,341 (= E_f)		

Графическая экстраполяция кривой $E_t = f(t)$ против $t - 0$ дает $E_0 = 510$. Из первых 4 мин. реакции получается

$$\frac{\Delta E}{\Delta t} = \frac{E_0 - E_4}{4} = \frac{0{,}510 - 0{,}468}{4} = \frac{0{,}042}{4} = 0{,}0105.$$

Затем вычисляют по уравнению (3):

$$K \cdot C = 0{,}0105 \cdot \frac{1}{0{,}510 - 0{,}341} = \frac{0{,}0105}{0{,}169} = 0{,}062 \text{ единицы Кунитца на 1 } мл \text{ смеси.}$$

Препарат рибонуклеата (2,5 *мкг* белка на 1 *мл*) в пробе разводят 1 : 2, концентрация рибонуклеазы составляет 0,00125 *мг/мл* опытной смеси и препарат содержит

$$\frac{0{,}062 \text{ ед/мл}}{0{,}00125 \text{ мг/мл}} = 50 \text{ единиц Кунитца в 1 } мг \text{ белка.}$$

При вычислении по уравнению (2) получается:

$$K \cdot C = 2{,}3 \cdot \frac{\Delta \log (E_t - E_f)}{\Delta t}$$

$$\text{для } \Delta t = 3 \text{ мин.} \qquad \Delta \log (E_t - E_f) = 0{,}2014 - 0{,}1038 = 0{,}0976.$$

$$K \cdot C = 2{,}3 \cdot \frac{0{,}0976}{3} = 0{,}075 \text{ единиц Кунитца в 1 } мл \text{ смеси.}$$

Из наклона прямой (см. Бергмайер [43] стр. 39) вычисляют также значение E_0: для $t = 1$ мин.

$$\frac{K \cdot C}{2{,}3} = \frac{\Delta \log (E_t - E_f)}{\Delta t} = \frac{0{,}0976}{3} = 0{,}0325\,;$$

$$\log (E_t - E_f) = 0{,}2014 - 1;$$

затем по уравнению (2):

$$-(0{,}2014 - 1) = 0{,}0325 \cdot 1 - \log (E_0 - E_f)\,;$$

$$\log (E_0 - E_f) = 0{,}0325 + 0{,}2014 - 1;$$

$$\log (E_0 - E_f) = 0{,}2339 - 1;$$

$$E_0 - E_f = 0{,}171;$$

$$E_0 = 0{,}171 + 0{,}341;$$

$$E_0 = 0{,}512.$$

Это хорошо согласуется с графически экстраполяционным значением $E_0 = 0{,}510$.

Источники ошибок. Активность рибонуклеазы зависит от ионной силы раствора. При неизвестной концентрации соли соответственно этому исследуемый раствор нужно сильно разбавить или

диализировать. Большие колебания в ионной силе изменяют величины E_0 и E_f. Сравнивая их с известной активностью кристаллической рибонуклеазы поджелудочной железы, возможно измерение величины $E_0 - E_f$, если она не слишком мала. Если для предотвращения помутнения (вызванного образованием нуклеопротеидов) требуются очень высокие концентрации соли, то определять рибонуклеазу лучше описанным ниже титриметрическим методом.

Титриметрический метод

Принцип. Рибонуклеаза отщепляет 3-пиримидиннуклеотиды от циклических 2′,3′-пиримидиннуклеотидов. Освобожденную кислоту определяют по количеству щелочи, которое необходимо для поддержки постоянного pH. Берут нужный объем извести для нейтрализации как мерку для активности. Оптимальный pH лежит между 7,2 и 7,4.

Вносят поправку для степени диссоциации продуктов реакции (оптимум pH для цитидинфосфата лежит при 7,0; для уридинфосфата — при 7,2). Расщепление циклических нуклеотидов возрастает также при увеличении ионной силы. Циклический цитидинфосфат почти в два раза быстрее расщепляется, чем циклический урацилнуклеотид.

Реактивы (для приготовления растворов 1—3 можно применять дистиллированную воду, раствор 4 приготовляется на бидистиллированной воде): 1) циклический нуклеотид (приблизительно 0,015 *М* раствор): 56 *мг* бариевой соли нуклеотида растворяют в 10 *мл* дистиллированной воды; 2) этилендиамин-тетраацетат ($3,3 \times 10^{-4}$ *М* раствор ЭДТА): 12,5 *мг* натриевой соли этилендиамин-тетраацетата (ЭДТА-$Na_2H_2 \cdot 2H_2O$) растворяют в 100 *мл* дистиллированной воды; 3) хлорид натрия (0,1 *М* раствор): 5,845 *г* хлорида натрия растворяют в дистиллированной воде, объем доводят до 1000 *мл*; 4) рибонуклеаза, РНК-аза (100 *мкг* белка на 1 *мл*): 5 *мг* рибонуклеазы и 0,5 *мг* ЭДТА-$Na_2H_2 \cdot 2H_2O$ растворяют в 50 *мл* бидистиллированной воды. Раствор бариевой соли циклического нуклеотида готовят в количестве полудневной потребности. 0,005 н. раствор натронной щелочи готовят ежедневно свежим из 0,1 н. основного раствора NaOH, устанавливая заново концентрацию по HCl. Рибонуклеаза в растворе, содержащем ЭДТА (задержка инактивирования тяжелыми металлами), стабильна при 2—4° почти два месяца.

Техника. Значение pH реакционной смеси в течение расщепления должно отклоняться от первоначально установленного pH не больше чем на 0,04 (в противном случае анализ повторяют, точнее соблюдая условия приготовления раствора). В процессе определения (10—15 мин.) не должна изменяться скорость размешивания. Перед каждым определением и после него pH-метр проверяют стандартным буфером; при измерениях сдвиги pH не больше чем 0,02, а при серийных измерениях в среднем не больше чем на 0,001 единиц

можно не принимать во внимание. Микробюретки проверяют (по крайней мере перед их первым употреблением) на пропускаемость (утечку)—(наполняют 0,05 н.NaOH и погружают кончик в 3 *мл* воды); в условия опыта (скорость размешивания, глубина погружения) включают и то, что в течение 15 мин. не допускаются сдвиги pH. Точность pH-метра ограничивает точность метода, причем это зависит меньше от абсолютной точности и больше от постоянства отклонений при повторных измерениях. Метод можно в принципе переработать на автоматическое титрование.

Постановка опыта. Измеряемый объем: 3 *мл*; комнатная температура — работают в комнате с постоянной температурой или реакционный сосуд (маленький стаканчик) ставят в стакан, который помещают в термостат. Реакционную смесь перемешивают магнитной мешалкой. Титруют из проверенной микробюретки (капилляр кончика бюретки погружают в реакционный раствор). Для защиты от абсорбции CO_2 из воздуха на поверхность реакционного раствора направляют струю азота. Измерения pH проводят pH-метром. Последовательно в реакционный сосуд (очень маленький стаканчик емкостью не более 10 *мл*) пипеткой отмеривают: 1,0 *мл* раствора нуклеотида (1), 0,2 *мл* раствора ЭДТА (2), 1,0 *мл* раствора хлорида натрия (3), бидистиллированной воды столько, чтобы объем после добавления пробы составил 3,0 *мл*. pH устанавливают равным 7,20 при помощи 0,1 н. раствора едкого натра и соляной кислоты; стабильность значения pH проверяют в течение нескольких минут. pH раствора пробы устанавливают на 7,20 (такая точность излишня, если буферная емкость пробы невелика). Реакция начинается путем добавления 0,1—0,8 *мл* пробы. В течение 10 мин. каждые 40—80 сек. добавляют только 0,005 н. раствора NaOH , чтобы под воздействием фермента pH образующегося кислого раствора только слегка превышал 7,20. Наблюдают за стрелкой pH-метра и отмечают момент передвижения стрелки выше pH 7,20. Время откладывают (на абсциссе) против расхода натронной щелочи (на ординате). Прямая не пересекает нулевую точку координат. При подведении итогов первые 90 сек. оставляют без внимания, так как колебания pH после добавления фермента не зависят (частично) от воздействия фермента на субстрат.

Вычисление. В течение первых 15 мин. превращается 2—3% субстрата; концентрация продуктов распада, тормозящих реакцию, еще низкая; измеряют начальную скорость реакции. Поэтому отношение между количеством фермента и скоростью оборотов (1*x* NaOH в мин.)[1] прямое. Для получения активности в единицах Кунитца надо одновременно анализировать стандартный препарат спектрофотометрическим методом.

Можно условно принять за единицу активности то количество фермента, которое в условиях титриметрического определения за

[1] 1 *x* NaOH соответствут 1 *мл* 0,001 н. NaOH; 1 *мл* 0,005 н. NaOH соответствует 5 *x*.

одну минуту расщепляет количество уридин 2′,3′-фосфата, соответствующее 0,1 «x NaOH». Так как образующаяся уридинфосфорная кислота при pH 7,20 диссоциируется почти полностью, поправку для не диссоциированного нуклеотида вносить не требуется; при низких значениях pH, например при определении гепарина, такая поправка необходима.

Для вычисления результатов расход NaOH («x NaOH») откладывают против времени, параллель этой прямой проводят через нулевую точку координат. Отсчитывают расход *мл* NaOH в минуту. Полученные величины умножают на 10. Получают «титриметрические единицы» в реакционной смеси. Для вычисления единиц на 1 *мл* пробы следует разделить полученную величину на количество *мл* пробы, взятых в опыт.

Пример. 10 *мкг* рибонуклеазы растворяют в 0,2 *мл* воды и анализируют. Расход 0,005 н. раствора NaOH: 0,036 «x NaOH»/мин. 0,036 · 10 = 0,36 титриметрических единиц; единица соответствует 27,8 *мкг* рибонуклеазы.

Источники ошибок и специфичность. Кроме рибонуклеазы, до настоящего времени не известен другой фермент, который катализирует расщепление циклического пиримидиннуклеотида. Можно обойтись без отделения термолабильных фосфатаз, которые необходимы при определении активности с рибонуклеиновой кислотой в качестве субстрата. Белки мешают реакции с циклическим пиримидиннуклеотидом меньше, чем с рибонуклеиновой кислотой. С другой стороны, титриметрический метод [47] сравнительно мало чувствителен. Рибонуклеаза может быть достаточно надежно определена при содержании до 2 *мкг* в пробе (1 *мл*), в то время как спектрофотометрическим методом можно определить концентрации порядка 0,25 *мкг* в пробе. Метод осаждения позволяет при тщательном соблюдении всех условий осуществить измерение до 0,003 *мкг* рибонуклеазы. Однако иногда бывает трудно исключить мешающее влияние некоторых ферментов.

Точность метода порядка 5%.

Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

Определение рибонуклеазы [45]

(КФ 2.7.7.16)

Принцип. При pH 4,0 уранилацетат в разведенном растворе $HClO_4$, прибавленный к смеси, содержащей РНК и РНК-азу, осаждает рибонуклеиновую кислоту и нуклеотиды, содержащие аминогруппу. В растворе остается уридин-фосфорная кислота, циклический фосфат уридина и уридиновые полинуклеотиды. Эти соединения, как продукты действия РНК-азы на субстрат, можно определить спектрофотометрически.

Реактивы: 1) имеющийся в продаже препарат РНК очищают и приготовляют 2%-ный раствор, доводя pH до 5,0 или 7,5 [39].

Раствор стоек в замороженном состоянии; 2) кристаллический препарат РНК-азы растворяют в 0,2 *M* ацетатном буферном растворе с pH 5,0 или в трис-буферном растворе pH 7,5, содержащем 0,2 н. NaCl. Оба раствора содержат 0,001% желатины. Раствор фермента сохраняется довольно долго; 3) запасной раствор уксуснокислого уранила: а) для анализов при pH 5,0 готовят 100 *мл* 0,8%-ного раствора уксуснокислого уранила ($UO_2Ac_2 \cdot 2H_2O$) в 0,85%-ном растворе $HClO_4$; б) для анализов при pH 7,5 приготовляют 100 *мл* 0,8%-ного раствора уксуснокислого уранила в 0,33%-ном растворе $HClO_4$. Перед употреблением оба раствора разбавляют 5 объемами воды. Раствор рибонуклеазы в фосфатном буфере дает с этими реактивами осадок фосфатов.

Техника. 0,5 *л* раствора РНК приливают к 0,4 *мл* соответствующего буфера, затем прибавляют 0,1 *мл* раствора РНК-азы (2) и начинают инкубацию. Инкубируют в толстостенных пробирках в течение 10 мин. при температуре 37°. Реакцию прерывают, прибавляя 3 *мл* соответствующего раствора уксуснокислого уранила (3а или 3б). Содержимое пробирок перемешивают, оставляют на 15 мин. и затем центрифугируют. 1 *мл* прозрачной надосадочной жидкости разбавляют водой до 6 *мл* и определяют абсорбцию при 260 *ммк*. Параллельно производят анализ проб, не содержащих РНК-азы или РНК. Методику стандартизируют при помощи растворов, содержащих известное количество кристаллической РНК-азы. Минимальная растворимость аденозин-, цитидин- и гуанозин-3′-фосфатов отмечается при pH 3,8—4,0.

Точность метода 5%.

Определение рибонуклеазы [46]

Принцип. Методика заключается в измерении помутнения, образующегося при воздействии на РНК подкисленным раствором альбуминов. Это помутнение зависит от длины цепочки полимера РНК.

Реактивы: 1) РНК из дрожжей растворяют в 0,13 *M* растворе NaCl, содержащем 0,02 *M* двузамещенного ортофосфата натрия, чтобы получить раствор, содержащий 500 *мкг/мл* РНК с pH 7,3; 2) кристаллическая панкреатическая РНК-аза; 3) фракция альбуминов сыворотки [см. (46)]; 4) реактив, вызывающий помутнение, содержащий 0,3 *мг/мл* альбумина сыворотки в 0,1 *M* растворе ацетатного буфера с pH 4,0, и 1 *мг* желатины на 1 *мл* для стабилизации мути. Для получения мути к 1 *мл* нуклеиновой кислоты прибавляют 5 *мл* этого реактива и интенсивность помутнения определяют в нефелометре.

Техника. 0,5 *мл* раствора РНК и 0,5 *мл* раствора РНК-азы в фосфатносолевом растворе (1), содержащем от 10 до 50 *мкг* панкреатической РНК-азы, смешивают и инкубируют в течение 0—30 мин. при температуре 37°. После этого прибавляют 5 *мл* реактива, вызывающего помутнение (4); одновременно прерывается ферментативная

реакция. Определяют помутнение при 400 *ммк*. Количество разложенной РНК определяют из соответственно составленной стандартной кривой по разнице исходного помутнения, вызванного 500 *мкг* РНК и конечного помутнения после ферментативной реакции. По количеству деполимеризованного субстрата можно рассчитать соответствующее ему количество кристаллической РНК-азы в сыворотке или моче, которые следует развести стократно.

Определение дезоксирибонуклеазы [47]
(КФ 3.1.4.5)

П р и н ц и п. Метод основан на колориметрическом определении дезоксирибонуклеотидов, освобождающихся при воздействии фермента на субстрат.

Р е а к т и в ы: 1) 200 *мг* высокополимеризированной натриевой соли ДНК [47] растворяют в 100 *мл* воды или 0,05 *М* растворе $MgSO_4$ при исследовании фермента, активизируемого Mg^{+}, получение ДНК см. [48]; 2) 0,1 *М* ацетатный буфер с pH 5,6 для исследования ДНК-азы II и 0,2 *М* вероналовый или такой же буфер трис с pH 7,5 для анализа дезоксирибонуклеазы I; 3) 3,0 *М* раствор трихлоруксусной кислоты; 4) дифениламиновый реактив Dische [10]. На каждые 40 *мл* 1%-ного раствора дифениламина в ледяной уксусной кислоте прибавляют 1 *мл* концентрированной H_2SO_4. Реактив приготовляют непосредственно перед употреблением. Детали приготовления реактивов см. [47].

Т е х н и к а. Смесь, состоящую из 1 *мл* субстрата, 1 *мл* соответствующего буфера и 1 *мл* сыворотки или мочи инкубируют в течение 4 час. при 37° [37], а затем реакцию прерывают, прибавляя 1 *мл* трихлоруксусной кислоты. Слепую пробу приготовляют таким же образом, с той лишь разницей, что сыворотку прибавляют после трихлоруксусной кислоты. Пробы центрифугируют в течение 15 мин. со скоростью 10 000 оборотов в минуту или фильтруют. 1,5 *мл* фильтрата переносят в небольшие пробирки и прибавляют 3,0 *мл* дифениламинового реактива (4). Пробирки погружают в кипящую водяную баню на 20 мин., затем вынимают и через 20 мин. стояния при комнатной температуре колориметрируют при 600 *ммк* при сравнении со слепой пробой реактивов, т. е. смеси 1,5 *мл* воды и 3 *мл* дифениламинового реактива (дополнительную контрольную пробу производят для внесения поправки на аутолитическую нуклеазовую активность путем инкубации смеси гомогената с буфером отдельно от субстрата, а субстрат и трихлоруксусную кислоту прибавляют под конец инкубации).

По найденной экстинкции рассчитывают количество образовавшейся дезоксипентозы при помощи стандартной кривой, построенной по результатам, полученным из серии стандартных анализов. Точность метода 10%.

Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Henry R.* et al. Clin. Chem., 1957, **3**, 77.
2. *Шлыгин Г. К.* и сотр. В сб. «Методические письма Ин-та биол. и мед. химии АМН СССР», 1962, вып. 15, 1963.
3. *Contro L.* e *Maroni G.* Atti Acad. med. Lombardia, 1960, **15**, 322.
4. *Tietz N.* et al. Amer. J. Clin. Path., 1959, **31**, 148.
5. *Natelson S.* Microtechniques of clinical chemistry, 2 ed. Springfield, 1961.
5a. *Асатиани В. С.* Биохимический анализ, ч. I. Тб.,Грузмедгиз, 1949.
6. *Roe J.* a. *Byler R.* Anal. Bioch., 1963, **6**, 451.
7. *Lukasik S.* u. *Orlowski M.* Pol. Tyg. Lek., 1958, **13**, 1643; Pol. Arch. Med. Wewn., 1960, **30**, 975.
8. *Zieve L.* a. *Vogel W.* J. Lab. Clin. Med., 1961, **57**, 586.
8a. *Dole V.* J. Clin. Investig., 1956, **35**, 150.
8b. *Pascaud M.* C. r. Acad. Sci., 1955, **241**, 227.
9. *Larson E.* Microelectrometric method for blood cholinesterase determination, Div. of Lab., Calif. State Dept. Public Health, 1957.
10. *Синицын С. Н.* Гигиена труда и профзаболеваний, 1961, № 6, 22.
11. *Пушкина Н. Н.* Биохимические методы исследований, М., Медгиз, 1963, стр. 202.
12. *King P.* a. *King E.* J. Clin. Pathol., 1954, **7**, 322.
12a. *King E.* a. *Jegatheesan K.* J. Clin. Path., 1959, **12**, 85.
13. *Kirk J.* et al. J. Lab. Clin. Med., 1962, **59**, 705.
14. *Henry R.* a. *Chiamori N.* Clin. Chem., 1959, **5**, 402.
15. *Dryer R.* et al. J. Biol. Chem., 1957, **225**, 177.
16. *Harper A.* a. *Joung E.* Bioch. J., 1959, **71**, 696.
17. *Доста Г. А.* и *Островский Ю. М.* Вопросы медицинской химии, 1962, **8**, 477.
18. *Мешкова Н. П.* и *Северин С. Е.* Практикум по биохимии животных. М., Сов. наука, 1950.
19. *Glick D.* Bioch. J., 1937, **31**, 521.
20. *Kaufman K.* Ann. Internal. Med., 1954, **41**, 533.
21. *Fleisher I.* et al. Arch. Ind. Health., 1956, **14**, 510.
22. *Bonting S.* a. *Flatherstone R.* Arch. Bioch. Bioph., 1956, **61**, 89.
23. *Kramer D.* a. *Gamson R.* Anal. Chem., 1958, **30**, 251.
24. *Kalow W.* a. *Lindsay H.* Can. J. Bioch. Physiol., 1955, **33**, 568.
25. *Ms. Ocker D.* a. *Daniel L.* Arch. Bioch. Biophys., 1959, **79**, 1.
26. *Gal E.* a. *Roth E.* Clin. Chim. Acta, 1957, **2**, 316.
27. *Smitt R.* et al. Amer. J. Clin. Path., 1950, **20**, 269.
28. *Main E.* et al. Bioch. J., 1961, **78**, 769.
29. *Burman D.* Amer. J. Clin. Path., 1962, **37**, 134.
30. *Sawitzky A.* et. al. J. Lab. Clin. Med., 1948, **33**, 203.
31. *Mac. Donald W.* et al. Arch. Ind. Hyd. Ocoup. Med., 1952, **6**, 271.
32. *Голиков. С. Н.* и *Розенгарт В. И.* Холинэстеразы и антихолинэстеразные вещества. Л., «Медицина», 1964.
32a. *Seligman A.* a. *Nachlas M.* J. Clin. Invest., 1950, **29**, 31.
33. *Reiner M.* Standard methods of clinical chemistry. N. Y. **1**, 1953.
34. *Gomori G.* Amer. J. Clin. Path., 1954, **24**, 99.
35. *Gutman E.* a. *Gutman A.* J. Biol. Chem., 1940, **136**, 201.
36. *King E.* Practical biochemistry, L., 1947.
37. *Huggins C.* a. *Smith G.* J. Biol. Chem., 1947, **170**, 467.
38. *Roe J.* J. Biol. Chem., 1955, **212**, 335.
39. *Dodgston K.* et al. Bioch. J., 1954, **58**, 182.
40. *Malmstrom B.* a. *Glick D.* Arch. Bioch. Bioph., 1952, **40**, 56.
41. *Glick D.* et al. Arch. Bioch. Bioph., 1955, **54**, 513.
42. *Ratenburg A.* a. *Seligman A.* Arch. Bioch., Bioph., 1956, **60**, 198.
43. *Zöllner N.* h. *Holom G.* В кн.: Bergmeyer H. Methoden der enzymatischen Analyse. Weinheim. 1962, стр. 793.
44. *Kunitz M.* J. Biol. Chem., 1946, **164**, 563.
45. *Dickman S.* a. *Trupin K.* Arch. Bioch. Bioph., 1954, **52**, 362.
46. *Houck J.* Bioch. Bioph. Acta, 1957, **26**, 649.
47. *Allfrey V.* a. *Mirsky A.* J. Gen. Physiol., 1952, **36**, 227.
48. Хроматография на бумаге, под ред. И. М. Хайса и К. Мацека. М., ИЛ., 1962, 784.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗИДАЗ, АМИЛАЗ И ДР.

Определение β-глюкозидазы [1]
(КФ 3.2.1.21)

Принцип. β-глюкозидаза из микроорганизмов (а также фермент из сладкого миндаля — эмульсин) расщепляет арил- и алкил- β-глюкозиды с освобождением глюкозы. По данному методу определяют глюкозу, которая отщепляется от синтетического субстрата β-*D*-глюкозидо-гидрохинона (арбутин).

При определении β-глюкозидазы в почвах необходимо учитывать, что величины pH водной вытяжки из почвы зависят от характера почвы (глинистый песок, песчаная глина, нейтральная почва). Оптимум pH 5,6—6,4. Оптимальная концентрация субстрата 0,5 *г* арбутина в опыте.

Реактивы для ферментативной реакции: 1) буферный раствор (pH 6,2): а) 358 *г* двузамещенного фосфата натрия ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) растворяют при подогревании в дистиллированной воде, доводят объем до 1000 *мл* и охлаждают до 25°; б) 60 *мл* ледяной уксусной кислоты разбавляют дистиллированной водой до 1000 *мл*. Одну часть раствора *а* смешивают с 1,8 частью (по объему) раствора *б*. Величину pH контролируют pH-метром со стеклянным электродом и регулируют ее добавлением раствора *а* или *б*; 2) арбутин (10%-ный раствор в/о): 25 *г* арбутина растворяют в дистиллированной воде, объем доводят до 250 *мл*.

Реактивы для определения глюкозы: 3) раствор Фелинга: а) 34,64 *г* сульфата меди ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) растворяют в дистиллированной воде, объем раствора доводят до 500 *мл*; б) 173 *г* сегнетовой соли и 50 *г* едкого натрия растворяют в дистиллированной воде до 500 *мл*. Непосредственно перед употреблением растворы *а* и *б* смешивают в соотношении 1 : 1 по объему; 4) йодид калия (33%-ный раствор в/о): 3,3 *г* йодистого калия растворяют в дистиллированной воде, объем доводят до 10 *мл*; 5) тиосульфат натрия (0,1 н. раствор): 24,82 *г* тиосульфата натрия ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) и 1 *г* $Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$ растворяют в дистиллированной воде, объем доводят до 1000 *мл*; 6) крахмал (индикатор): 0,5 *г* растворимого крахмала размешивают с небольшим количеством воды, переносят в 100 *мл* кипящего 25%-ного раствора NaCl и кипятят в течение приблизительно 1 мин. Растворы устойчивы в течение длительного времени.

Техника. В 100 *мл* мерную колбу переносят: 10 *г* сухой пробы почвы или растительной пробы (после ориентировочного опыта),

1,5 *мл* толуола, хорошо перемешивают встряхиванием, через 15 мин. добавляют 1,5 *мл* раствора буфера (1) и 5 *мл* раствора арбутина (2).

Колбы закрывают резиновыми пробками и держат в течение 23 час. в термостате при 37°. В случае надобности встряхивают, дополняют 37°-ной водой до 100 *мл*, встряхивают и снова оставляют в термостате при 37°. Точно через 24 часа в надосадочной жидкости определяют содержание глюкозы.

Пустой опыт требуется только, если анализируют пробы растений или болотистой почвы. Пустой опыт ставят как основной, только с водой вместо раствора арбутина (2). Активность растительной пробы очень колеблется, первые анализы предназначаются только для ориентировки. Затем, при повторении анализа, ставят столько проб, чтобы в реакцию вступало приблизительно $^3/_4$ предполагаемого содержания арбутина.

Определение глюкозы. Для каждой серии анализов ставят пустой опыт, для чего используют 10 *мл* раствора Фелинга плюс 20 *мл* воды.

В главном опыте берут 10 *мл* раствора Фелинга в эрленмейровскую колбу емкостью 100 *мл*. Сюда же приливают 20 *мл* надосадочной жидкости (см. выше). Колбу оставляют на кипящей водяной бане в течение ровно 5 мин., после чего быстро охлаждают под струей воды из водопроводного крана до температуры ниже 25°. Затем в колбу отмеряют 3 *мл* 33%-ного (в/об) раствора йодида калия и 4 *мл* 25%-ного раствора серной кислоты и титруют 0,1 н. раствором тиосульфата натрия из бюретки (индикатор — крахмал, который предварительно готовят, растворяя 0,5 *г* растворимого крахмала в 100 *мл* кипящего 25%-ного раствора хлорида натрия и охлаждая). Разность между количеством (в *мл*) раствора тиосульфата, затраченного на титрование главного опыта, и таковым, затраченным на пустой опыт, определяет меру активности фермента.

При соблюдении всех условий опыта точность метода может быть доведена до 3%.

Определение β-глюкуронидазы [2]
(КФ 3.2.1.31)

П р и н ц и п. Метод основан на фотометрическом определении фенолфталеина, освобождающегося при ферментативном гидролизе субстрата (фенолфталеинглюкуронида) глюкуронидазой крови.

Р е а к т и в ы: 1) 0,01 *М* раствор фенолфталеинглюкуронида (субстрат); 2) 0,1 *М* ацетатный буферный раствор (pH 4,5); 3) 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты; 4) 1 н. раствор едкого натра; 5) щелочной реактив: смесь 200 *мл* глицинового буферного раствора (pH 10,45) с 50 *мл* 0,5 н. раствора едкого натра.

Фенолфталеинглюкуронид готовят следующим образом. Сначала получают натрийфенолфталеинфосфат: 50 *г* фенолфталеина отвеши-

вают в круглодонную колбу, ставят на лед и прибавляют 40 *мл* сухого хлороформа и смесь 50 *мл* хлорокиси фосфора и 50 *мл* хлороформа. Сюда же добавляют по каплям при размешивании 40 *мл* сухого пиридина и на следующий день — 150 *мл* воды (небольшими порциями), затем избыток (около 300 *мл*) 40%-ного раствора едкого натра. Выпадающие при охлаждении игольчатые кристаллы фосфата натрия удаляют фильтрованием, а к фильтрату прибавляют избыток (на конго красный) концентрированной соляной кислоты (около 10 *мл*). Выделяющийся при этом гуммозный осадок фенолфталеиндифосфорной кислоты отделяют стеклянной палочкой. Полученную массу помещают в фарфоровой чашке на кипящую водяную баню и растворяют добавлением сначала 20 *мл* 50%-ного раствора едкого натра и под конец воды до 200 *мл*.

3 *мл* раствора фенолфталеинфосфата нейтрализуют слабой щелочью и разбавляют водой до 10 *мл*. Эту порцию впрыскивают ежедневно в течение 6 дней кролику, получающему морковь и капусту, но не получающему воды.

После этого у кролика в течение 8 дней собирают под толуолом мочу, фильтруют, подкисляют (на конго красный) 6 н. раствором соляной кислоты и, собрав 800 *мл* мочи, экстрагируют ее четырьмя порциями этилацетата по 125 *мл*.

Этилацетатную вытяжку центрифугируют, сливают через вату, выпаривают до небольшого объема в вакууме при 60° и приливают к остатку насыщенный раствор цинхонидина в этилацетате до прекращения выпадения осадка. Полученное цинхонидиновое производное дважды перекристаллизовывают, растворяя в минимальном количестве горячего метилового спирта и осаждая четырьмя объемами горячего этилацетата. Таким образом, получают чистый фенолфталеинмоно-β-глюкуронид (с 1 молекулой кристаллизационного метилового спирта), служащий для приготовления раствора субстрата.

Т е х н и к а. В две вассермановские пробирки отмеривают по 0,1 *мл* испытуемого раствора, 0,8 *мл* 0,1 *М* раствора ацетатного буфера, 0,1 *мл* 0,01 *М* раствора фенолфталеинглюкуронида. В третью, контрольную, пробирку отмеривают те же количества за исключением субстрата. Пробирки ставят в термостат при 38° и отмечают время. Для крови (плазма, сыворотка, эритроциты) инкубация длится 15—24 часа, для других тканей достаточно 1—5 час.

По окончании инкубации отмечают время, останавливают ферментативную реакцию и осаждают белки, добавляя в каждую пробирку по 1 *мл* 5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты и размешивая. Центрифугируют в течение 10 мин., сливают надосадочную жидкость через ватные фильтры в кюветы колориметра с меткой на 6 *мл*. В кюветы предварительно наливают по 2,5 *мл* щелочного раствора 5.

Осадок на фильтре промывают водой и промывную жидкость собирают в кювету до объема 6 *мл*.

Контрольную кювету применяют для нулевой установки гальванометра (к ее содержимому добавляют 0,1 *мл* 0,01 *M* раствора фенолфталеинглюкуронида). Отсчеты ведут при длине волны 540 *ммк*. Калибровочную кривую (ср. стр. 468) строят по стандартным растворам фенолфталеина. Расчет ведут по формуле

$$n = \frac{10p \cdot v}{t \cdot m},$$

где n — число единиц глюкуронидазы на 1 *г* ткани; p — количество фенолфталеина в микрограммах, освобожденное при инкубации; t — продолжительность инкубации в часах; v — объем экстракта, *мл*; m — навеска ткани, *г*.

Если анализ ведут в крови, то результат выражают в единицах глюкуронидазы на 100 *мл*, подставляя

$$\frac{100}{V_0} = \frac{10v}{m},$$

где V_0 — объем анализируемой жидкости, *мл*.

Точность метода около 8%.

Пеллегрино и Виллани [3] несколько модифицировали метод Фишмена и сотрудников (pH буферного раствора 12,4, фотометрирование при 550 *ммк*) для определения β-глюкуронидазы в лимфатической ткани.

Недостатком определения β-глюкуронидазы по Фишмену является длительность инкубации, а также малая стойкость цветной реакции вследствие перехода красной двунатриевой соли в бесцветную трехнатриевую.

Метод можно использовать и для анализа растительного материала, а также и микроорганизмов.

Определение β-глюкуронидазы по Верити, Каперу и Брауну[1] [4]

(КФ 3.2.1.31)

Принцип. При ферментативном гидролизе 1-нафтил-β-*D*-глюкуронида, присутствующего в реакционной смеси в качестве флуорогенного субстрата, освобождается β-нафтол в количестве, пропорциональном активности глюкуронидазы, содержащейся в исследуемом материале. Концентрация β-нафтола измеряется при длине волны возбуждающего света 345 *ммк* в области 455 *ммк*.

Реактивы: 1) субстрат: 1-нафтил-β-*D*-глюкуронид; очищают от примеси β-нафтола экстракцией этиловым эфиром в аппара-

---

[1] M. A. Verity et al. Arch. Biochem. Biophys., 1964, 106, 386.

те Сокслета, с объемом камеры 200 *мл* при 40° в течение 45 мин. Очищенный субстрат растворяют в нескольких каплях *N*, *N*-диметилформамида и доводят до требуемого объема. Кристаллический препарат стоек при хранении в холодильнике, однако раствор субстрата постепенно разлагается с выделением β-нафтола. По прошествии 10 дней хранения растворенного субстрата в рефрижераторе его необходимо повторно очищать; 2) рабочий раствор субстрата; 0,04 *М* β-нафтол; растворяют в этиловом эфире, высушивают при 40° и хранят под силикагелем; при построении калибровочной кривой готовят серию разведений стандартного раствора β-нафтола в пределах концентраций от 0,1 до 0,5 *мкмоля* в 2,6 *мл* с добавлением всех компонентов реакционной смеси (см. ниже); 4) ацетатный буферный раствор, 0,1 *М*, содержащий хлористый калий в концентрации 0,15 *М*, pH 4,5; 5) 0,5 н. раствор едкого натра.

Техника. *Исследуемый материал* (печень). Животных забивают декапитацией, извлекают порции печени весом 25—75 *г*, обсушивают с поверхности, взвешивают на торзионных весах и помещают в 4—5 *мл* 0,25 *М* охлажденного раствора сахарозы. Ткань гомогенизируют в присутствии того или иного активатора глюкуронидазы (в зависимости от условий опыта) и центрифугируют при 600 *g* в течение 10 мин. для удаления неразрушенных клеток, ядер и детрита.

Постановка опыта. Аликвотные пробы гомогената исследуемой ткани (0,05 *мл*) вносят в пробирки, применяемые для серологического анализа, предварительно нагретые до 37° и содержащие по 0,05 *мл* 0,04 *М* раствора субстрата и 0,55 *мл* 0,1 *М* раствора ацетатного буфера. Пробирки инкубируют при 37° в течение 10 мин.; для остановки ферментативной реакции в каждую пробирку добавляют по 2 *мл* 0,5 н. раствора едкого натра, доводя реакцию проб до pH 11. Пробирки помещают в мелко раздробленный лед. Флуоресценцию опытной пробы измеряют против слепой пробы, не содержащей фермента. Полученный результат, за вычетом показания контроля, переводят в мкмоли β-нафтола, пользуясь калибровочной кривой.

Измерение флуоресценции проб производят, пользуясь 150-ваттной ксеноновой лампой в качестве источника света и сверхчувствительным микроамперметром. Исследуемую жидкость помещают в кварцевые кюветы размером 10 × 10 × 48 *мм*. Для получения возбуждающего света с требуемой длиной волны (345 *ммк*) применяют соответствующий светофильтр, измерение флуоресценции производят также через светофильтр, с максимумом пропускания в области 455 *ммк*.

Источники ошибок. Флуоресценция β-нафтола в 0,5 н. растворе едкого натра медленно возрастает в течение 2-часового периода и в отсутствие ткани, поэтому отсчет следует брать сразу после добавления щелочи, по крайней мере не позднее 10 мин.

Данных о проверке метода другими лабораториями пока не имеется.

Определение амилазы [5]

(Амилаза: α — 3.2.1.1; β — 3.2.1.2)

Принцип. Исследуемую пробу инкубируют с забуференным раствором крахмала при 40° в течение 30 мин. Затем в свободном от белков фильтрате определяют редуцирующие вещества. Разница в содержании редуцирующих веществ в пробе до и после инкубации, выраженная в *мг* глюкозы/100 *мл*, условно принимается за единицу амилазной активности. Амилазную активность мочи можно выразить в *ед/час*, т. е. в *мг* глюкозы на количество *мл* мочи, выделенных за час.

Реактивы: 1) фосфатный буфер, 0,1 *М* раствор, pH 7,0: растворяют 4,55 *г* KH_2PO_4 и 9,35 *г* Na_2HPO_4 в воде и объем доводят до 1 *л*; 2) субстрат крахмала: 1,5 *г* крахмала (растворимого картофельного крахмала) добавляют к 100 *мл* фосфатного буфера, доводят до кипения и кипятят 3 мин., затем охлаждают до комнатной температуры и объем доводят до 140 *мл* фосфатным буфером. При соблюдении стерильности раствор можно хранить в течение 4 месяцев, для стерилизации удобно пользоваться автоклавом. Раствор субстрата почти всегда бывает в некоторой степени мутным. Добавление 10 *мл* 0,86%-ного раствора бензоата натрия предохраняет раствор от порчи в течение 1 года при комнатной температуре, не влияя на ферментативную активность; 3) серная кислота $^2/_3$ н. раствор; 4) вольфрамат натрия, 10%-ный раствор; 5) реактивы для определения глюкозы [6].

Макрометод. Отмеряют 1,0 *мл* сыворотки или плазмы (или 0,50 *мл* мочи + 0,5 *мл* 0,85%-ного раствора NaCl) в пробирку, обозначенную «контроль», и 7,0 *мл* крахмального субстрата в «опытную» пробирку. Обе пробирки помещают в водяную баню при 40° и через 5 мин. добавляют 1,0 *мл* сыворотки или плазмы (или 0,5 *мл* мочи+0,5 *мл* 0,85%-ного NaCl) в «опыт». Ровно через 1 час вынимают пробирки из бани, быстро добавляют 1,5 *мл* $^2/_3$ н. H_2SO_4 в каждую пробирку и перемешивают, затем добавляют 0,5 *мл* 10%-ного вольфрамата натрия и опять перемешивают. Добавление кислоты полностью прекращает амилазную активность.

В «контроль» добавляют 7,0 *мл* субстрата и перемешивают. Фильтруют или центрифугируют и в жидкости определяют сахар любым методом [6].

Отсчитывают стандарт, контроль и опыт против «холостого опыта».

«Холостой опыт» на реактивы и «стандарт» глюкозы находят, определяя сахар в 2 *мл* аликвотах следующих смесей. «Холостой опыт»: 7,0 *мл* субстрата + 0,5 *мл* 10%-ного раствора вольфрамата натрия + 1,5 *мл* $^2/_3$ н. раствора H_2SO_4 + 1,0 *мл* воды; «стандарт»: 7,0 *мл* субстрата + 0,5 *мл* 10%-ного раствора вольфрамата натрия + 1,5 *мл* $^2/_3$ н. раствора H_2SO_4 + 1,0 *мл* стандартного раствора глюкозы, содержащего 2 *мг* глюкозы/*мл* (развести 1 : 5 основной стандартный раствор глюкозы, содержащий 10 *мг/мл*).

Вычисление:

$$\text{мг глюкозы/100 мл контроля} = \frac{A_{\text{контр}}}{A_{\text{ст}}} \times 2 \times \frac{100}{\text{мл контроля}}$$

$$\text{мг глюкозы/100 мл пробы} = \frac{A_{\text{опыт}}}{A_{\text{ст}}} \times 2 \times \frac{100}{\text{мл пробы}},$$

где $A_{\text{контр}}$ — показание контроля, $A_{\text{ст}}$ — показание стандартного раствора, $A_{\text{опыт}}$ — показание главного опыта.

Единицы амилазы/100 *мл* = *мг* глюкозы/100 *мл* «опыта» — *мг* глюкозы/100 *мл* «контроля».

Для выражения результатов в *ед/час* для мочи:

$$\text{Единицы амилазы/час} = \frac{A_{\text{опыт}} - A_{\text{контроль}}}{A_{\text{стандарт}}} \times 2 \times \frac{\text{объем в мл/час}}{\text{объем в мл взятой пробы}}.$$

Если активность выше 600 ед. в 1 *мл* сыворотки или выше 1200 ед. в 0,5 *мл* мочи, «опыт» нужно ставить заново с меньшим объемом пробы, дополняя объем 0,85%-ным раствором хлористого натрия. Активность амилазы мочи не должна превышать 600 *ед/час*.

Полумикрометод. Для «контроля» и «опыта» смешивают в пробирке: 0,3 *мл* сыворотки, 2,1 *мл* субстрата, 0,45 *мл* $^2/_3$ н. раствора H_2SO_4 и 0,15 *мл* 10%-ного раствора вольфрамата натрия. После центрифугирования надосадочную жидкость переносят в реакционную пробирку (объем $2{,}0 \pm 0{,}1$ *мл*) и продолжают анализ, как в макрометоде. Если «холостой опыт» и «стандарт» берут как для макрометода, вычисляют, как указано выше, но не делят на число *мл* пробы.

Источники ошибок. 1. *Стандарт глюкозы.* Стандарт глюкозы нужно ставить с забуференным крахмальным субстратом, так как высокая концентрация фосфатного буфера изменяет pH анализируемого раствора, влияя на его поглотительную способность. Так, например, в некоторых методах pH стандартов глюкозы становится 10,4 после добавления щелочного раствора меди. Такое изменение pH вызывает повышение поглотительной способности приблизительно на 6%.

2. *Антикоагулянт.* Гепаринизованная плазма дает такие же результаты, что и сыворотка, тогда как цитрат и оксалат, связывая ионы кальция, подавляют активность на 20%.

3. *Загрязнение проб слюной.* Нужно остерегаться загрязнения проб слюной, так как в слюне содержание амилазы в 700 раз выше по сравнению с сывороткой.

4. *Влияние ионов хлора*. Хорошо известно, что ионы хлора активируют α-амилазу. При отсутствии хлористого натрия активность амилазы не обнаруживается и лишь 0,01 *М* концентрация хлористого натра достаточна для выявления оптимальной активности.

В сыворотке концентрация ионов хлора 0,1 *М*, а в моче содержание хлора выше. В опыте при разведении 1 *мл* сыворотки до 8 *мл* конечная концентрация ионов хлора составляет 0,0125 *М*, что все же превышает критическую концентрацию. А если в опыт берется меньше чем 1 *мл* сыворотки и 0,5 *мл* мочи, объем дополняют физиологическим раствором (0,85% или 0,15 *М* NaCl).

5. *Использованный в методе буфер* обусловливает pH 7,0 ± 0,... реакционных смесей. Отклонение pH на 0,2 единиц дает около 3% ошибки.

6. *Температурный оптимум* для амилазной активности 50—55°. Но в большинстве лабораторий определение ведут при 37°. Это на 13,5% ниже по сравнению с 40°. Эта разница компенсируется либо продлением инкубационного времени на 13,5% или же инкубируют 30 мин., но вносят поправку на 13,5% в полученные результаты.

7. *Мутность*. Одним из основных недостатков метода Сомоджи является мутность конечного окрашенного раствора для определения сахара, что является результатом присутствия в нем остатков крахмала. В предложенной модификации окрашенный раствор оптически всегда прозрачен.

3. *Стабильность проб*. Сыворотка и моча сохраняют активность в течение 1 недели при комнатной температуре, и в течение нескольких месяцев в холодильнике. Устойчивость можно продлить до года добавлением равного объема глицерина. Стабильность наивысшая в присутствии ионов кальция и хлора и при pH 6,6—7,2. Фториды ингибируют амилазу.

Точность метода ±10% при активности, равной 80 *ед*/100 *мл*, и ±3%, если активность около 300 *ед*/100 *мл*.

Норма. Вышеописанным методом обнаружена активность от 38 до 118 единиц в сыворотке мужчин, и от 46 до 141 единиц в сыворотке женщин.

На уровень сывороточной амилазы не влияют пища, сон, тренировка.

В моче активность от 66 до 740 *ед*/100 *мл* у людей (6 час. или 24 часа собирания мочи), нормальное выделение — от 43 до 245 *ед/час*. Вечером в моче содержание амилазы на 30% выше, чем утром.

Рекомендуется вести анализ не в суточном количестве, но в пробах мочи, выделенной в течение определенного промежутка времени.

Определение амилазы [7]
(по цветной реакции с пикриновой кислотой)

Принцип. Метод основан на колориметрическом определении активности амилазы по цветной реакции глюкозы с пикриновой кислотой.

Реактивы: 1) 1%-ный раствор растворимого крахмала:

в чашке емкостью 150 *мл* суспендируют 1 *г* растворимого крахмала в 5 *мл* холодной воды, затем добавляют 90 *мл* кипящей воды. Крахмал должен раствориться, после чего раствор кипятят в течение 1 мин. и доводят объем до 100 *мл* в мерной колбе. Если предполагают употреблять этот раствор дольше 1 дня, то его следует заморозить. В замороженном состоянии раствор можно использовать в течение почти двух недель. Правда, через 2 или 3 дня крахмал начинает мутнеть; в этом случае содержащую раствор колбу следует нагревать в течение нескольких секунд на кипящей водяной бане до приобретения раствором прозрачности; 2) 0,2 *М* фосфатный буферный раствор с pH 7,2: растворяют 7,62 *г* безводного двуосновного фосфата калия KH_2PO_4 и 20,45 *г* двунатриевого фосфата Na_2HPO_4 в таком количестве воды, чтобы общий объем раствора составил 1 *л*; 3) 0,5 *М* раствор хлористого натрия; 4) сухая пикриновая кислота; 5) стандартный раствор глюкозы готовят растворением 200 *мг* чистой глюкозы в 1 *л* насыщенного раствора пикриновой кислоты; таким образом, 0,6 *мг* глюкозы приходится на 3 *мл* стандартного раствора; 6) насыщенный раствор углекислого натрия.

Т е х н и к а. В 2 пробирки размером 20 × 150 *мм* вводят пипеткой по 5 *мл* раствора крахмала и добавляют по 3 *мл* 0,2 *М* фосфатного буферного раствора с pH 7,2, затем в каждую пробирку добавляют по 1 *мл* 0,5 *М* раствора хлористого натрия и пробирки помещают на водяную баню с постоянной температурой 40°. Одна из пробирок (*Б*) служит для сравнения, в другой (*А*) производят ферментативное расщепление. После того как пробирки приняли температуру воды бани, в пробирку *А* добавляют 1 *мл* сыворотки и оставляют на 15 мин.

По истечении этого времени добавляют пикриновую кислоту и основательно взбалтывают пробирку для обеспечения насыщения раствора пикриновой кислотой. В пробирку *Б* добавляют эквивалентное количество сухой пикриновой кислоты и после насыщения — 1 *мл* сыворотки, и пробирку снова встряхивают. Добавление сыворотки после насыщения пикриновой кислотой препятствует амилолизу в пробирке холостой пробы. Содержимое обеих пробирок фильтруют и 3 *мл* взятого из каждой пробирки фильтрата вместе с 1 *мл* насыщенного раствора углекислого натрия отмеряют в пробирки для определения сахара. В третью пробирку отмеряют 3 *мл* стандартного раствора глюкозы и 1 *мл* насыщенного раствора углекислого натрия. Все пробирки кипятят на водяной бане в течение 20 мин., после чего их охлаждают, разбавляют содержимое водой до 20 *мл* и производят отсчет на фотоэлектрическом колориметре со светофильтром на 520 *ммк*. Можно также употреблять и обычный колориметр для визуального определения, однако в этом случае желательно разбавлять стандартный раствор до 10 *мл*, а не 20 *мл*, и разбавлять главный и холостой растворы таким образом, чтобы окраска была столь же интенсивной, как и окраска стандартного раствора.

Уменьшение содержания сахара в *мг*, вызванное добавлением 1 *мл* сыворотки, вычисляют по формуле

$$P = \frac{2RD}{SD_0},$$

где P — уменьшение содержания сахара (*мг*), вызванное добавлением 1 *мл* сыворотки; R — интенсивность окраски неизвестного раствора; S—интенсивность окраски стандартного раствора; D — разведение неизвестного раствора; D_0 — разведение стандартного раствора.

Тот же способ вычисления применяется и к холостому раствору и найденное значение вычитается из полученного в главном опыте. Величину в процентах к нормальной активности можно получить, умножая результат на 25.

Те же авторы предлагают инкубировать анализируемую плазму (или сыворотку) с субстратом — крахмалом (буфер рН 7,2) в присутствии хлористого натрия. Концентрацию общего количества восстанавливающих веществ до и после инкубации определяют фотометрически по цветной реакции со щелочным медным реактивом и фосфорно-молибденовой кислотой. Полученную разность используют как меру амилолитической активности анализируемой пробы. Анализ можно вести и в вольфрамовокислом фильтрате цельной крови. Точность метода около 10%.

Определение амилазы [8]
(по количеству расщепленного крахмала)

Принцип. Метод основан на определении способности амилазы расщеплять крахмал; фотометрический анализ ведут по цветной реакции крахмала с йодом.

Реактивы: 1) субстрат — свежеприготовленный 1,2%-ный раствор растворимого крахмала (см. стр. 529); 2) фосфатный буферный раствор (рН 7,2); 3) 0,5 *М* раствор хлористого натрия; 4) 1 н. раствор соляной кислоты; 5) 0,3%-ный раствор йода в 3%-ном растворе йодистого калия.

Техника. Метод разработан для анализа сыворотки или плазмы крови и мочи, но может быть применен и для анализа тканей.

5 *мл* 1,2%-ного раствора крахмала (60 *мг*), 3 *мл* фосфатного буферного раствора и 1 *мл* 0,5 *М* раствора хлористого натрия отмеряют в пробирку *А*; те же количества отмеряют в контрольную пробирку *Б*. В третью пробирку *В* (холостой опыт) отмеряют 5 *мл* воды, 3 *мл* буфера и 1 *мл* 0,5 *М* раствора хлористого натрия.

Все пробирки погружают в водяную баню, нагретую до 37°. Через 5 мин. в пробирку *А* прибавляют 1 *мл* исследуемого раствора фермента (сыворотка, плазма, моча). Точно через 30 мин. после этого во все пробирки добавляют по 2 *мл* 1 н. раствора соляной кислоты. Благодаря этому рН становится ниже 2,0; в этих условиях прекращается действие амилазы в главном опыте и предотвращается

ее действие при последующем добавлении фермента в контрольную пробирку.

Затем прибавляют по 1 *мл* исследуемого раствора фермента в пробирки *Б* и *В*, размешивают и отмеряют по 2 *мл* реакционной смеси из каждой пробирки (*А*, *Б* и *В*) в соответственно отмеченные колбы с меткой на 500 *мл*, содержащие по 400 *мл* воды и 5 *мл* 1 н. раствора соляной кислоты. В каждую колбу прибавляют по 1 *мл* раствора йода, доливают до метки и колориметрируют при длине волны 620 *ммк* (гальванометр устанавливают на 100 по кювете с холостым раствором *В*).

Расчет ведут по формуле

$$\frac{\text{отсчет Б} - \text{отсчет А} \cdot 60}{\text{отсчет Б}} = \text{мг расщепленного крахмала.}$$

За единицу амилазной активности принимают количество фермента, катализирующее в условиях опыта (60 *мг* крахмала) расщепление 10 *мг* крахмала за 30 мин. до отсутствия окраски с йодом при длине волны 620 *ммк*.

Умножив количество расщепленного крахмала (в *мг*) на 10, получают число единиц амилазы в 100 *мл* сыворотки или плазмы.

Из существующих фотометрических методов определения амилазы описанный метод [8] дает наиболее воспроизводимые результаты, отличаясь одновременно простотой выполнения. Точность метода может быть доведена до 5%. Определение амилазы широко практикуется в пищевой химии для исследования меда [1], муки [2], молока [3]. Этот же метод применим для определения амилазной активности в растительном материале и в микроорганизмах.

Определение амилазы [9]

Принцип. Глюкоза, образующаяся при ферментативном гидролизе крахмала, количественно восстанавливает феррицианид; получающийся при этом ферроцианид дает окрашенное соединение в присутствии фосфорномолибденовой кислоты; оптическая плотность раствора измеряется при 520 *ммк*. Метод разработан применительно к определению амилазы сыворотки крови. Для сравнения во втором варианте количество образовавшейся глюкозы определяется по восстановлению щелочного раствора гидроокиси меди.

Реактивы: 1) фосфатный буферный раствор, pH 6,8: к 250 *мл* 0,2 *М* раствора однозамещенного фосфата калия добавляют 18 *мл* 0,2 н. раствора едкого натра и доводят водой до 1000 *мл*; 2) субстрат, 1%-ный растворимый крахмал: суспендируют 1 *г* растворимого крахмала в 5 *мл* холодной воды, затем добавляют 90 *мл* кипящей воды и кипятят 1 мин., после охлаждения доливают водой до 100 *мл*. Раствор крахмала хранят в замороженном состоянии.

---

[1] J. Valin. Ann. Falsificat. Fraudes, 1958, **51**, 269.

[2] J. Le Clerc. Cereal Chem., 1951, **9**, 53.

[3] E. Guy a. R. Jenness. J. Dairy Sci., 1958, **41**, 13.

Перед употреблением раствор оттаивают и разбавляют буфером в отношении 5 : 3; 2) стабилизированный вольфрамовый реактив для осаждения белка, исходный раствор (10); 3) рабочий раствор вольфрамового реактива разбавляют водой в отношении 1 : 1; 4) щелочной раствор феррицианида калия: растворяют 3 *г* феррицианида калия и 4 *г* карбоната натрия в 1000 *мл* воды; 5) исходный фосфорномолибденовый реактив по Фолину — Ву [11]; 6) рабочий раствор фосфорномолибденового реактива: 333 *мл* исходного фосфорномолибденового реактива доводят водой до 1000 *мл*; 7) щелочный раствор меди: 40 *г* безводного углекислого натра растворяют в 400 *мл* дистиллированной воды, затем добавляют 7,5 *г* виннокаменной кислоты и 4,5 *г* пентагидрата сернокислой меди, доводят водой до 1000 *мл*; 8) стандартный раствор глюкозы: готовят серию разведений исходного стандартного раствора глюкозы в насыщенной бензойной кислоте, разбавляя его водой таким образом, чтобы получить растворы с концентрацией 10; 20; 30; 40 и 50 *мг/мл*.

Техника. В две пробирки отмеряют по 0,5 *мл* исследуемого материала, добавляют по 3,5 *мл* забуференного субстрата, предварительно нагретого в водяной бане до 37,5°, смешивают и опускают в водяную баню при 37,5° первую пробирку на 15 мин., а вторую — на 30 мин. (точно). По прошествии этого времени добавляют по 1 *мл* разведенного реактива для осаждения белка (3). В контрольную пробирку наливают 3,5 *мл* субстрата и 1 *мл* реактива 3 для осаждения белка и центрифугируют одновременно с пробирками, содержащими исследуемый материал в течение 10 мин. Проба, инкубированная в течение 15 мин., служит для определения сахара феррицианидным методом, а инкубированная в течение 30 мин.— для определения с медным реактивом.

Определение глюкозы с феррицианидным реактивом. К 0,5 *мл* надосадочной жидкости, взятой из опытной и стандартных проб, приливают по 2 *мл* щелочного феррицианидного раствора, помещают в кипящую водяную баню на 10 мин., охлаждают в течение 2 мин. и добавляют по 3 *мл* рабочего раствора фосфорномолибденового реактива (6). Таким же образом обрабатывают слепую пробу, взяв вместо надосадочной жидкости 0,5 *мл* воды. Определяют оптическую плотность опытной и стандартной проб против слепой пробы при 460 *ммк*.

Определение глюкозы с медным реактивом. К 0,5 *мл* надосадочной жидкости, такому же количеству стандартного раствора глюкозы и воды (слепое определение) добавляют по 2 *мл* щелочного медного реактива и помещают в кипящую водяную баню на 8 мин., а затем охлаждают водопроводной водой Во все пробирки добавляют по 2 *мл* исходного фосфорномолибденового реактива и вновь погружают в кипящую воду на 5 мин., после чего охлаждают водопроводной водой и доводят объем до 25 *мл*, тщательно перемешивают и определяют оптическую плотность против слепой пробы при 520 *ммк*.

Вычисление. Активность амилазы рассчитывают, вычитая показания слепого опыта (в *мг* на 100 *мл*) из показания пробы, содер-

жащей исследуемый материал, принимая во внимание показания стандарта и разведение материала.

Источники ошибок. Чувствительность феррицианидного метода зависит от концентрации реактива, ее можно повысить, пользуясь более концентрированными растворами фосфорномолибденового реактива; приведенная концентрация феррицианидного реактива соответствует содержанию восстанавливающих сахаров порядка 600 *мг* на 100 *мл*.

Данных о проверке метода другими лабораториями пока не имеется.

Определение уропепсина [12]

(КФ 3.4.1.1)

Принцип. Моча инкубируется с забуференным гомогенизированным молоком при 37°. Казеин под действием уропепсина превращается в нерастворимый параказеин. Момент, когда на стенках пробирки появляются частицы параказеина, принимается за конец реакции.

Реактивы: 1) ацетатный буферный раствор, pH 4,9. Смешивают 42 *мл* 10%-ного ратвора NaOH и 9,2 *мл* ледяной уксусной кислоты; затем доводят до 100 *мл* водой и проверяют pH; в случае надобности pH доводят до 4,9 (добавлением раствора кислот или щелочи); 2) 2 н. раствор HCl. Разбавляют концентрированную соляную кислоту водой в соотношении 2 : 13; 3) метилоранж 0,2%-ный водный раствор; 4) смесь молока с буфером. Смешивают равные части ацетатного буферного раствора и свежего гомогенизированного молока.

Техника. 1. Берут пробу мочи, выделенную за определенный промежуток времени.

2. К 2,0 *мл* мочи добавляют 1 каплю индикатора и 0,1 *мл* 2 н. HCl; pH должен быть 3 или меньше, что подтверждается изменением окраски индикатора (красный цвет). Возможно, потребуется добавление нескольких капель 2 н. раствора. HCl

3. Мочу «активируют» инкубацией в течение часа или дольше при 37° на водяной бане.

4. В три разные пробирки помещают по 3 *мл* воды, ацетатного буферного раствора и молочно-буферной смеси; все реактивы ставят на водяную баню при 37° на 1 мин.

5. Переносят 0,20 *мл* активированной мочи в реакционную пробирку, добавляют 0,80 *мл* воды и 1,0 *мл* ацетатного буферного раствора и перемешивают.

6. Реакцию начинают добавлением 0,5 *мл* молочно-буферной смеси, перемешивают однократно и включают секундомер. Сразу же после этого пробирку с реакционной смесью помещают в водяную баню при 37°; через каждые 10—15 сек. слегка перемешивают и пробирку моментально вынимают из бани, для того чтобы легче обнаружить конец реакции. Конечная точка — это выделение осадка в

виде тонкой пленки на внутренних стенках реакционной пробирки и на поверхности смеси. Через несколько секунд осадок становится творожистым.

Определение нужно проводить в двух параллельных опытах и контролировать показания параллельных проб в течение 10 сек. Если для выпадения осадка требуется меньше 80 или больше 400 сек., опыт нужно разбавлять водой до получения осадка в этом промежутке времени. Объем активированной мочи + вода должен быть 1 *мл*.

Вычисление. Результаты выражают в единицах уропепсина, выделенного за 1 час. 1 единица соответствует количеству *мл* активированной мочи × 10, нужному для получения осадка за 100 сек. Эта единица эквивалентна 0,26 *мкг* кристаллического пепсина.

$$ед/час = \frac{1}{10} \times \frac{v}{v_1 h} \times \left(\frac{100}{T}\right)$$

где v — общий объем мочи в *мл*, h — время, за которое выделяется v, v_1 — объем активированной мочи, использованной в опыте, *мл*; T — секунды, нужные для выделения осадка, что является показателем конца реакции.

Источники ошибок. *Устойчивость образцов.* Уропепсин стабилен в течение нескольких недель в холодильнике и в течение нескольких дней при комнатной температуре, если не происходит размножения в нем микробов. Рекомендуется добавление толуола или же 0,5—1 *мл* 25%-ного раствора H_2SO_4. Оптимальный pH для сохранения мочи находится между 3 и 7. Однако некоторые авторы находят понижение активности на 10—30% на 4-й день при хранении в холодильнике с толуолом. Точность метода около ±5—10%.

Нормальные значения. Нормальное выделение уропепсина составляет 15—50 *ед/час*. Показано, что содержание уропепсина на 60% выше у мужчин, чем у женщин. Выделение уропепсина более интенсивно происходит утром и ночью.

Определение пепсина и уропепсиногена [13]

(пепсин: КФ 3.4.1.1)

Принцип. Метод основан на способности пепсина в определенных условиях расщеплять белковую молекулу гемоглобина с освобождением тирозина и триптофана. По концентрации последних судят о пептической активности того или иного биологического субстрата.

Реактивы: 1) раствор соляной кислоты (30 *мл* концентрированной соляной кислоты на 100 *мл* дистиллированной воды); 2) 0,5 н. раствор едкого натра; 3) 5%-ный раствор трихлоруксусной кислоты; 4) реактив Фолина; 5) 2,5%-ный водный раствор гемоглобина.

Техника. Из суточного количества мочи отбирают 20 *мл*, помещают в градуированный цилиндр, подкисляют раствором соляной кислоты до pH 1,5 и доводят дистиллированной водой до 25 *мл*.

Таким же путем доводят раствор гемоглобина до pH 1,5. В пробирку отмеривают 1 *мл* подкисленной мочи, добавляют 5 *мл* раствора гемоглобина и выдерживают на водяной бане при 37° в течение 30 мин. Затем добавляют 10 *мл* 5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, фильтруют и в фильтрате определяют тирозин. Для этого к 2 *мл* фильтрата добавляют 5 *мл* дистиллированной воды, 8 *мл* раствора щелочи и 3 *мл* реактива Фолина, предварительно разведенного водой в три раза. После добавления последнего развивается голубая окраска. Через 30 мин. на фотоколориметре определяют оптическую плотность при длине волны 580 *ммк.* Опыт сравнивают с контролем.

Расчет содержания пепсиногена в суточном количестве мочи производят по формуле

$$D \cdot \frac{x}{0,04} \cdot \frac{25}{20} \cdot v = ед/24\ часа,$$

где D — оптическая плотность исследуемой мочи: x — количество тирозина в *мг*, которое определено по калибровочной кривой: v — объем мочи за 24 часа.

Определение пепсина в желудочном соке производят аналогичным способом, с той лишь разницей, что для исследования берут 5 *мл* желудочного сока. Расчет производят на 100 *мл* желудочного сока.

Рассматриваемый метод обладает рядом положительных сторон. Он основан на определении специфических свойств (протеолиз) фермента и может быть использован для определения последнего в любых биологических жидкостях. Его высокая чувствительность позволяет определить как ничтожно низкие, так и высокие концентрации фермента. Величина ошибок ниже 2—3%.

Сложность подготовительных работ заключается только в приготовлении гемоглобина.

Определение пепсина в желудочном соке и пепсиногена по В. Н. Туголукову [14]

Принцип. Определение фермента главных желез желудка основано на протеолитическом действии пепсина in vitro. Наиболее приемлемым субстратом, по степени переваривания которого можно судить о содержании пепсина, является раствор сухой плазмы.

Степень превращения белкового субстрата пепсином можно установить путем определения величины осадка белка, образующегося после осаждения его раствором трихлоруксусной кислоты и центрифугирования. В центрифужную градуированную пробирку помещают 1 *мл* испытуемой жидкости и 2 *мл* 2%-ного раствора сухой плазмы (опыт). В другую такую же пробирку наливают 1 *мл* той же жидкости, но освобожденной от фермента кипячением, и 2 *мл* раствора плазмы (контроль). Пробирки ставят в термостат при 37° на 20 часов, затем в каждую пробирку добавляют по 2 *мл* 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Содержимое в пробирках перемешивают и центрифугируют при 1500 *об/мин* в течение 10 мин.

По разнице в объеме осадка в опыте и в контроле оценивают степень переваривания субстрата.

Зависимость степени переваривания от концентрации пепсина выражается следующей формулой:

$$M = (A - B) \cdot \frac{40}{A},$$

где M — показатель переваривания, A — величина осадка в контроле, B — объем осадка в опыте; 40 — постоянная величина, установленная экспериментальным путем.

Определение пепсина в желудочном соке. Порцию желудочного сока фильтруют через бумажный фильтр. Микропипеткой берут 0,1 *мл* профильтрованного сока, переносят в обычную пробирку, в которую предварительно было налито 9,9 *мл* дистиллированной воды, и тщательно перемешивают. Пипетку несколько раз ополаскивают содержимым пробирки. В градуированную центрифужную пробирку помещают 1 *мл* этого (разведенного в 100 раз) желудочного сока (опыт). В другую градуированную пробирку помещают 1 *мл* прокипяченного разведенного сока (контроль). В каждую пробирку добавляют по 2 *мл* раствора сухой плазмы. Пробирки ставят в термостат при 37° на 20 час. После этого в каждую пробирку добавляют по 2 *мл* 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Содержимое пробирок перемешивают стеклянной палочкой до получения однородной суспензии и центрифугируют 10 мин. при 1500 *об/мин*. Определив величину осадка в опытном и контрольном образцах, вычисляют показатель переваривания субстрата по указанной выше формуле. По данным таблицы производят пересчет его на содержание фермента в исследуемом биологическом материале в миллиграммах стандартного пепсина. Так как для исследования берут 1 *мл* желудочного сока, разведенного в 100 раз, то полученный результат умножают на 10 000. В этом случае содержание пепсина в желудочном соке будет выражено в миллиграмм-процентах.

Пример. Объем осадка в контроле оказался равным 1 *мл*, а объем осадка в опыте — 0,5 *мл*. В этом случае показатель переваривания белка (M) будет равен $(1{,}0-0{,}5) \cdot \frac{40}{1} = 20$. Находим в таблице (см. [13], стр. 109) эту величину. Она соответствует 0,08 *мг* стандартного пепсина. Следовательно, в 100 *мл* желудочного сока содержится 800 *мг%* пепсина. В норме «часовое напряжение» пепсина после капустного пробного завтрака равно 2,1—4,5 *г%*.

Определение уропепсиногена. В зависимости от целей исследования и условий работы пепсиноген определяют или в суточном количестве мочи, или в моче, полученной натощак. В последнем случае уровень пепсиногена выражают в миллиграммах в час. Для этого необходимо знать время первого и второго мочеиспускания и объем мочи при втором мочеиспускании.

В градуированную пробирку помещают 1 *мл* мочи. В качестве контроля используют прокипяченную мочу. Дальнейший ход работы и вычисление показателя переваривания такие же, как при

определении пепсина в желудочном соке, с той лишь разницей, что полученный результат исследования в 1 *мл* умножают на количество мочи.

Определение напряжения пепсиногена в моче, полученной натощак, производят по формуле

$$\frac{v \cdot n}{t},$$

где v — объем мочи при втором мочеиспускании, n — содержание пепсиногена в 1 *мл* мочи; t — время (в часах) между первым и вторым мочеиспусканием.

Пример. Время первого мочеиспускания 7 час. утра, второго — 9 час. В последнем случае выделилось 100 *мл* мочи. В 1 *мл* этой мочи было определено 0,04 *мг* пепсиногена. Следовательно, напряжение пепсиногена в моче натощак будет равно

$$\frac{100 \cdot 0{,}04}{2} \text{ или } 2 \textit{ мг/час}.$$

Нормальное выделение пепсиногена с мочой за сутки — 38—96 *мг*, «часовое напряжение» натощак — 2—3 *мг/час*.

Определение пепсиногена в крови. Значительный интерес может представить определение пепсиногена в крови. Для этой цели может быть использован метод Яноушка [15]. Последний основан на определении полярографической активности сыворотки, повышающейся в результате протеолитического воздействия в кислой среде сывороточного пепсиногена на белки.

Согласно данному методу, полярографическую активность исследуемой сыворотки крови выражают в процентах понижения или повышения ее в отношении активности таковой практически здоровых лиц.

Учитывая, что фибрин обладает относительно пепсиногена выраженными абсорбционными свойствами, В. Н. Туголуков считает, что для получения правильного представления о содержании пепсиногена в крови следует производить определение его не в сыворотке крови, а в плазме.

В основе метода лежит способность пепсиногена в кислой среде расщеплять белки плазмы. По количеству расщепленных белков плазмы в стандартных условиях оценивается протеолитическая активность крови. Определяя зависимость протеолитической активности от концентрации фармакопейных препаратов пепсина, была составлена рабочая таблица для пересчета показателей указанной активности на содержание пепсиногена в миллиграмм-процентах по отношению к стандартному пепсину.

Техника. В обычную сухую центрифужную пробирку помещают несколько кристалликов щавелево- или лимоннокислого натрия. или 1—2 капли гепарина и 2 *мл* крови. В зависимости от целей исследования кровь берут натощак или после приема пищи. Полученную после центрифугирования плазму отсасывают пипеткой,

количественно переносят в химическую пробирку, где смешивают с равным объемом дистиллированной воды.

Плазму, разбавленную в соотношении 1 : 1, разливают по 0,5 *мл* в две градуированные пробирки. В одну из них добавляют 2 *мл* дистиллированной воды (контроль), в другую — 2 *мл* 0,1 н. раствора соляной кислоты (опыт). Обе пробирки помещают в термостат при 37° на 20 час. Затем в каждую пробирку добавляют по 2 *мл* 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Содержимое пробирок тщательно перемешивают стеклянной палочкой и центрифугируют 10 мин. при 1500 *об/мин*. Отмечают объемы осадка в контрольной и опытной пробирках.

Расчет производится по той же формуле, что и при определении уропепсиногена. Установив показатель переваривания (величина *M*) при помощи таблицы, определяют концентрацию пепсиногена в плазме.

По данному методу содержание пепсиногена в плазме здоровых лиц равно 2—8 *мг*%. Точность метода порядка 10%.

Пересчет показателей протеолитической активности плазмы (величина *M*) на содержание пепсиногена

Показатели величины *M*	Содержание пепсиногена в плазме, *мг* %	Показатели величины *M*	Содержание пепсиногена в плазме, *мг* %
1	2,0	7	8,6
2	2,6	8	10,4
3	3,4	9	12,4
4	4,4	10	14,6
5	5,6	11	16,0
6	7,0	12	17,6

Определение пепсина, пепсиногена, уропепсиногена [16]

(пепсин: КФ 3.4.4.1)

Принцип. Пепсин отщепляет от денатурированного гемоглобина вещества, которые растворяются в трихлоруксусной кислоте. Определяют содержание тирозина и триптофана в этих веществах. Ниже описывается основанный на этом метод измерения активности пепсина в желудочном соке.

Оптимум pH для протеолитической активности фермента лежит при 1,5—2,5, вернее, при 1,8—2,0. Карбобензокси-*L*-глутамил-*L*-фенилаланин оптимально расщепляется при pH 4,5, карбобензокси-*L*-глутамил-*L*-тирозин—при pH 4,0. Оптимальный pH для пепсина равен 3,1, если субстратом является гемоглобин, денатурированный мочевиной. При pH 4 обычно измеряется больше, чем 50% максимальной активности (денатурирование гемоглобина в 40%-ном щелочном растворе мочевины, ферментативная реакция в 10%-ном растворе мочевины). Оптимальная концентрация субстрата составля-

ет 1,6 гемоглобина/*мл*, скорость реакции остается постоянной при концентрации от 1,6 до 16 *мг* субстрата/*мл*.

Реактивы: 1) субстратный раствор: 2 *г* гемоглобина растворяют в 0,06 н. растворе соляной кислоты, объем доводят до 100 *мл* (pH приблизительно 1,8). Если имеется примесь стромы, ее отцентрифуговывают 15 мин. при 4000 *g*; 2) реактив на фенолы: 10 *г* вольфрамата натрия +2,5 *г* молибдата натрия +15 *г* сульфата лития +10 *мл* концентрированной соляной кислоты + 5 *мл* концентрированной фосфорной кислоты растворяют в дистиллированной воде, объем доводят до 100 *мл* водой. Перед употреблением одну часть раствора разбавляют двумя частями дистиллированной воды; 3) стандартный раствор тирозина (10^{-3} *M* тирозина): 181,19 *мг* *L*-(—)-тирозина растворяют в 1000 *мл* 0,2 н. раствора соляной кислоты; 4) трихлоруксусная кислота (5%-ный раствор в/о): 5 *г* трихлоруксусной кислоты растворяют в дистиллированной воде, доводят объем до 100 *мл*; 5) натронная известь 0,5 н. раствор.

Субстратный и тирозиновый раствор хранят при 0—4°. Для повышения стойкости к субстратному раствору можно добавить 2,5 *мг* мертиолата (натриевой соли *о*-[этилат ртути (II)-тио]-бензойной кислоты) на 100 *мл* и к тирозиновому раствору — формальдегид до 0,5%.

Техника. *Калибровочная кривая тирозина*. В зависимости от ожидаемой величины ферментной активности в эрленмейеровскую колбу емкостью 50 *мл* пипеткой отмеряют 0,2—1,0 *мл* стандартного раствора тирозина (0,2—1,0 *мкмоль* тирозина), 4,8—4,0 *мл* 0,2 н. раствора соляной кислоты, 10,0 *мл* 0,5 н. раствора натронной извести; при постоянном встряхивании добавляют 3,0 *мл* разбавленного фенолового реактива. Экстинкцию измеряют против пустого опыта с 0,2 н. раствором соляной кислоты вместо стандартного раствора тирозина и, как описано ниже в постановке опыта, откладывают против *мкмолей* тирозина.

Постановка опыта. Ферментативная реакция. Для каждого определения ставят пустой опыт, при этом к субстратному раствору добавляют 10 *мл* раствора трихлоруксусной кислоты, прибавляют фермент и через некоторое время отфильтровывают или отцентрифуговывают осадок (см. ниже).

В 20 *мл* центрифужную пробирку отмеряют пипеткой 5,0 *мл* субстратного раствора, держат в водяной бане с постоянной температурой 25°, или добавляют 0,01—0,04 *мл* разведенного желудочного сока и 0,99—0,96 *мл* 0,01 н. раствора соляной кислоты или смешивают 1,00 *мл* ферментного раствора (содержащего 5—20 *мкг* кристаллизированного белка). Дальше держат при 25°. Точно через 10 мин. добавляют 10,0 *мл* трихлоруксусной кислоты и встряхивают. Осадок отфильтровывают или отцентрифуговывают (20 мин. при 4000 *g*).

Реакция окрашивания: в эрленмейеровскую колбу емкостью 50 *мл* пипеткой отмеряют: 5,0 *мл* фильтрата или надосадочной жидкости, 10,0 *мл* 0,5 н. раствора натронной извести; при постоянном встряхивании добавляют 3,0 *мл* разбавленного фенолового реактива.

Экстинкцию раствора после добавления фенолового реактива измеряют против воды от 5 до 10 мин. в кюветах 1 *см* при 578 или 691 *ммк* (фотометр Эпендорфа), или 750 *ммк* (фотометр Цейса).

Вычисление.

За условную единицу активности ($П^{гем}$) принимают то количество фермента, которое при стандартных условиях (6 *мл* общий объем) с 0,1 *г* гемоглобина; температура 35,5°) расщепляет гемоглобин с такой большой начальной скоростью, что образующиеся за минуту растворимые в трихлоруксусной кислоте продукты распада дают с феноловым реактивом экстинкцию, одинаковую с получаемой от 1 *ммоля* тирозина. Инкубируют при 25° вместо 35,5°, активность фермента в 1,82 раза меньше.

Между активностью пепсина и количеством продуктов распада все же не существует линейной зависимости. Поэтому активность пепсина необходимо экстраполировать на ноль или работать с калибровочной кривой. Экстраполяционный метод применяют при определении активности чистейших ферментов: различные, достаточно малые количества фермента, как описано, инкубируют с субстратом.

После определения продуктов распада (с учетом результатов пустого опыта) *мкмоли* тирозина откладывают против величины активности фермента. Отсчитывают количество фермента, которое соответствует 1 *мкмолю* тирозина. Это количество фермента умножают на

$$10 \cdot 1000 \cdot \frac{5}{16} \cdot \frac{1}{1{,}82} = 1717.$$

Таким образом получают количество фермента, равное ($П^{гем}$) единице пепсина. Факторы умножения: 10 — пересчет 10 мин. на 1 мин., 1000 — пересчет *мкмолей* на *ммоли*, $\frac{5}{16}$ — пересчет объема после цветной реакции на объем пробы для ферментативной реакции, $\frac{1}{1{,}82}$ — пересчет 25° на 35,5°.

Экстинкции, отсчитанные на фотометре, на основании калибровочной кривой тирозина пересчитывают в *ммоли* тирозина и соответствующее этому количеству число единиц пепсина отсчитывают на абсциссе. Для пересчета на 1 *мл* надо делить на число *мл* пробы, взятой в опыт.

Пример. Калибровочная кривая, которая относится к L-(—)-тирозину, проходит прямолинейно до 1 *мкмоля* тирозина. Экстинкции, найденные в реакции окрашивания (объем 18 *мл*) с 1 *мкмолем* тирозина, составляют: при 578 *ммк* (фотометр Эпендорфа) — 0,490, при 691 *ммк* (фотометр Эпендорфа) — 0,620, при 750 *ммк* (спектрофотометр Цейса) — 0,665.

Для ферментативной реакции взяли 0,04 *мл* желудочного сока. После реакции окрашивания экстинкция при 578 *ммк* (за вычетом пустого опыта) составляет 0,186 (=0,38 *мкмоля тирозина*).

Пользуясь калибровочной кривой (см. выше), отсчитывают $2{,}18 \cdot 10^{-4}$ $П^{гем}$ (0,04 *мл* желудочного сока). Итак, желудочный сок содержит $2{,}18 \cdot 10^{-4} \cdot 25 = 5{,}45 \cdot 10^{-3}$ $П^{гем}$ пепсина на 1 *мл*.

Измерение активности пепсиногена. Пепсин разрушается при рН > 8. Пепсиноген при таком рН стабилен. Поэтому можно наряду с пепсином определить пепсиноген, если рН раствора, содержащего фермент и профермент, посредством раствора едкого натра устанавливают равным 8 и непосредственно для превращения пепсиногена в пепсин снижают рН соляной кислотой до 2—3. Дальнейшая техника та же, что и для пепсина.

Измерение активности уропепсиногена. Незначительные количества пепсиногена попадают из слизистой оболочки желудка в кровь и выделяются с мочой как уропепсиноген. Для превращения уропепсиногена в пепсин рН мочи подкисляют соляной кислотой до 2—3 и держат при 37° 1 час. Дальнейшая техника та же, что и для пепсина.

При соблюдении всех условий опыта точность может быть доведена до 3—5%.

Определение трипсина [17]

П р и н ц и п. Гемоглобин в растворе мочевины при щелочном рН денатурируется. Под виянием трипсина от денатурированного белка отщепляются вещества, которые растворяются в трихлоруксусной кислоте. В этих веществах определяют содержание тирозина и триптофана. Оптимальный рН протеолиза при помощи трипсина лежит между 7,0 и 8,0. Оптимальная концентрация субстрата 6,7 *мг* гемоглобина на 1 *мл* опытной смеси. Скорость реакции не измеряется и при более высокой концентрации гемоглобина. После добавления к субстрату 0,02 *M* ионов кальция предотвращается образование ферментативно недействующего белка.

Определение ингибитора трипсина [18]

П р и н ц и п. Протеолитическое действие определенного количества трипсина сравнивают с активностью такого же количества трипсина, к которому добавили некоторое количество мочи. Количество расщепленного белка трипсином определяют колориметрически, пользуясь биуретовой реакцией. Разность обеих проб служит основанием для количественного определения торможения трипсина.

Определение химотрипсина [19]

П р и н ц и п. Казеин гидролизуется при помощи химотрипсина, причем образуются продукты расщепления белка, содержащие тирозин и триптофан, которые после осаждения нерасщепленного (негидролизованного) субстрата измеряют спектрофотометрически. Оптимум рН для расщепления казеина химотрипсином лежит при 8,0. При конечной концентрации казеина оптимальная концентрация субстрата достигает 0,4%. Добавление хлорида кальция (0,005 *M*) к раствору субстрата повышает активность кристаллического α-химотрипсина на 10—12%. Эта концентрация оптимальна.

Определение химотрипсина и катепсина [20]

(химотрипсин: КФ А—3.4.4.5; В—3.4.4.6; катепсин КФ 3.4.4.9, 3.4.4.23)

Принцип. При ферментативном гидролизе субстрата *н*-глутарил-*L*-фенилаланил-β-нафтиламида освобождается нафтиламин, который образует азокраску с добавленным в реакционную среду нафтилэтилендиамином. Интенсивность развивающейся синей окраски, пропорциональную активности фермента, определяют спектрофотометрически при 560 *ммк*.

Реактивы: 1) химотрипсин: 1 *мг* кристаллического α-химотрипсина растворяют в 1 *мл* воды, раствор приготовляют для каждого теста отдельно; 2) глутарил-*L*-фенилаланил-β-нафтиламид: 150 *мг* препарата растворяют в 50 *мл* метилцеллозольва, затем последовательно добавляют 50 *мл* воды и 100 *мл* буферного раствора с желаемым pH; для каждого определения используют 1 *мл* забуференного раствора субстрата. Раствор устойчив по меньшей мере в течение 2 недель при хранении его при 4°; 2) цитратнофосфатный буферный раствор, 0,02 *М*, pH 7,5; можно применять также трис- или фосфатный буфер; 3) трихлоруксусная кислота, 40%-ный раствор; 4) азотистокислый натр, 0,1%-ный раствор; 5) сульфамат аммония, 0,5%-ный раствор; 6) н. раствор (1-нафтил) этилендиамин солянокислый; 0,5%-ный раствор в 95%-ном этаноле; 7) хлористый кальций, 0,01 *М*.

Техника. *Определение активности химотрипсина, построение калибровочной кривой.* К 1 *мл* забуференного раствора субстрата добавляют 1 *мл* раствора химотрипсина (1 *мг/мл*) и 0,2 *мл* 0,01 *М* раствора хлористого кальция. Смесь инкубируют в течение 2 час. при 37°. Для остановки реакции к смеси добавляют 1 *мл* 40%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, центрифугируют и к 1 *мл* надосадочной жидкости последовательно добавляют: 1 *мл* 0,1%-ного раствора азотистокислого натра, 1 *мл* 0,5%-ного сульфата аммония и 2 *мл* 0,05%-ного раствора н-(1-нафтил)-этилендиамина. Через 15 мин. определяют интенсивность синей окраски при 560 *ммк*. Полученные отсчеты наносят против концентраций фермента в *мг/мл*.

Постановка опыта. Свежий материал (кусочек ткани печени, почек и пр.) гомогенизируют в охлажденной дистиллированной воде, в соотношении 100 *мг* влажного веса ткани на 1 *мл* воды. Гомогенат центрифугируют в течение 15 мин. при 1000 *g*. Для каждого определения берут по 1 *мл* надосадочной жидкости, содержание азота в ней определяют по микрокьельдалю.

При определении активности тканевых протеиназ к 1 *мл* исследуемого материала добавляют 1 *мл* забуференного раствора субстрата и ведут определение так же, как и при определении активности химотрипсина.

Для определения активности ингибитора тканевых протеиназ к 1 *мл* раствора фермента (в данном случае химотрипсина) добавляют 1 *мл* исследуемого материала и, по прошествии 10 мин., 1 *мл* забуференного субстрата. Смесь инкубируют в течение 2 час. при 37°, определение заканчивают так же, как и в предыдущем случае.

Вычисление. Активность тканевых протеиназ рассчитывают в *мг/мл*, пользуясь калибровочной кривой. Ингибирующую активность тканей вычисляют в процентах от содержания азота в *мг* в исследуемом материале.

Источники ошибок и специфичность. Ионы ртути и трехвалентного железа в значительной степени подавляют гидролиз глутарил-*L*-фенилаланил-β-нафтиламида.

Помимо химотрипсина, гидролиз применяемого в данном методе субстрата вызывает лишь проназа. Присутствие различных тканевых протеолитических ферментов (папаина, фицина и бромелина, а также трипсина) не препятствует определению активности тканевых протеиназ типа химотрипсина и катепсина С.

Приложение

Синтез *н*-глутарил-*L*-фенилаланил-β-нафтиламида. *Получение солянокислого хлористого L-фенилаланила*. 21 *г* (0,1 *М*) пятихлористого фосфора добавляют к 280 *мл* сухого четыреххлористого углерода, перемешивают магнитной мешалкой в течение 15 мин., затем добавляют 15 *г* (0,09 *М*) *L*-фенилаланина, перемешивание продолжают в течение 18 час. Суспензию быстро фильтруют при отсасывании. Осадок промывают сухим четыреххлористым углеродом, затем петролейным эфиром и сохраняют в вакуумэксикаторе. Выход — 17,8 *г*. Ввиду высокой чувствительности препарата к влаге его применяют без дальнейшей очистки.

Получение L-фенилаланил-β-нафтиламида. 9,06 *г* (0,06 *М*) β-нафтиламида растворяют в 100 *мл* диоксана, содержащего 7 *мл* пиридина. Добавляют при постоянном перемешивании 8,8 *г* (0,04 *М*) солянокислого хлористого *L*-фенилаланина. Реакционную смесь оставляют на ночь, закрыв колбу пробкой, снабженной хлоркальциевой трубкой для предохранения от водяных паров. Затем реакционную смесь вливают в 300 *мл* воды, подкисляют до pH 2 добавлением концентрированной соляной кислоты и троекратно встряхивают с хлороформом. Водный слой обесцвечивают норитом, доводят до pH 8 добавлением карбоната натрия. Образуется белый осадок. Смесь оставляют в рефрижераторе на 24 часа. Осадок отделяют фильтрованием и перекристаллизовывают из водного этанола, выход 5 *г*, температура плавления 129,5—130°; данные анализа, рассчитанные для вещества состава $C_{19}H_{18}ON_2$ (290,34) (в %): С — 78,6; Н — 6,3; N — 9,7).

Получение глутарил-L-фенилаланил-β-нафтиламида. Ангидрид глутаровой кислоты в количестве 0,936 *г* (0,0082 *М*) растворяют в 30 *мл* сухого хлороформа при слабом нагревании. Таким же образом растворяют 2,38 *г* (0,008 *М*) реагента-*L*-фенилаланил-β-нафтиламида в 30 *мл* сухого хлороформа. Оба раствора охлаждают до комнатной температуры и перемешивают мешалкой в течение 20 час. Спустя час после начала перемешивания появляется осадок. В конце реакции смесь приобретает вид геля. Хлороформ отгоняют в вакууме,

а осадок перекристаллизовывают из смеси этанола с водой. Выход—2,1 г. Данные анализа, рассчитанные для вещества состава $C_{24}H_{24}O_4N_2$ (404, 43) (в %): С — 71,3; Н — 6,0; N — 6,9.

Данных о проверке метода другими лабораториями пока не имеется.

Определение энтерокиназы [21]

(энтеропептидаза: КФ 3.4.4.8)

П р и н ц и п. В основу метода положено активирование энтерокиназой специально приготовленного препарата поджелудочной железы, содержащего неочищенный трипсиноген. Минимальное количество энтерокиназы, способное вызвать в данных условиях триптическую активность, достаточную для переваривания казеина, принято за одну условную единицу энтерокиназы.

Р е а к т и в ы: 1) препарат трипсиногена (сухой препарат поджелудочной железы коров, специально приготовленный для данной цели) выпускается Московским мясокомбинатом; этот препарат может быть приготовлен также и в лаборатории [21]. При изготовлении препарата соблюдают меры предосторожности против самоактивирования трипсиногена. Теплые поджелудочные железы, взятые тотчас после забоя коров на мясо, очищают от жира, быстро измельчают над ступкой с 5-кратным количеством ацетона (от веса железы) и растирают в нем. Обычно берут железы от 10 и более коров; полученную массу доставляют в лабораторию, в тот же день фильтруют на воронке Бюхнера, растирают в новой порции ацетона, взятого в том же количестве, и оставляют в ацетоне до следующего дня. Затем ацетон сливают, осадок взбалтывают с равным количеством ацетона, отделяют путем фильтрования на воронке Бюхнера и промывают смесью, состоящей из равных объемов ацетона и эфира (взятой в 5-кратном количестве к весу железы), и, наконец, два раза эфиром (в 2—4-кратном количестве).

После указанной обработки вещество высушивают на воздухе, разложив тонким слоем на листках фильтровальной бумаги. По окончании высушивания его растирают в ступке или измельчают на шаровой мельнице и просеивают через тонкое сито. Полученное порошкообразное вещество сохраняют в хорошо закупоренных склянках в сухом месте (до полугода); 2) очищенный казеин (по Гаммерстену). Приготовляют его путем двукратного растворения в аммиаке (без нагревания) и осаждения уксусной кислотой. Исходным материалом может служить пищевой кислотный казеин. Определенное количество этого казеина размешивают с 10-кратным объемом дистиллированной воды и спустя несколько часов отделяют центрифугированием, после чего повторяют эту процедуру с таким же количеством воды. Далее казеин растворяют в 10-кратном объеме 0,1 н. раствора аммиака, фильтруют через полотно и осаждают добавлением 5%-ного раствора уксусной кислоты при помешивании (после отстаивания основную массу жидкости сливают, а осадок отделяют центри-

фугированием). Операцию осаждения и растворения повторяют еще один раз. Затем казеин многократно промывают дистиллированной водой до удаления следов кислоты. После этого его обрабатывают несколько раз этиловым спиртом с растиранием в ступке (каждый раз 3-кратным объемом), далее — несколько раз эфиром (2-кратным объемом), причем отфильтровывают на воронке Бюхнера с отсасыванием, наконец, высушивают на воздухе и измельчают в ступке. Выход составляет 60—70% от исходного вещества.

Перед началом использования казеина (особенно продажных образцов) его нужно испытать на способность створаживаться в описанных ниже условиях; 3) 0,2 *М* раствор фосфата (pH 7,16): смешивают 3 объемные части 0,2 *М* раствора KH_2PO_4 и 7 частей 0,2 *М* раствора Na_2HPO_4. Последний удобно готовить из насыщенного раствора, поскольку в сухом виде это вещество может содержать разное количество кристаллизационной воды. Растворы обоих фосфатов хранят с добавлением нескольких кристаллов тимола. Смесь можно сохранять не более двух недель; 4) 0,7 н. аммиачный буфер с pH 8,9: смешивают 1 объемную часть 0,7 н. раствора аммиака (проверенного титрованием) и 4 части 0,7 н. раствора NH_4Cl. Буфер можно сохранять 1—2 недели; 5) 5%-ный раствор казеина, содержащий кальций: раствор приготовляют в день проведения определения и используют только в течение данного дня. На одно определение энтерокиназы требуется 0,75—1,0 *г* очищенного казеина (приготовленного как указано выше). На 1 *г* казеина берут 11 *мл* 1,15%-ного раствора молочнокислого кальция и 9 *мл* 0,1 н. раствора аммиака (проверенного титрометрически). При использовании разных образцов казеина иногда возникает необходимость изменять концентрацию раствора молочнокислого кальция от 1 до 2%. Казеин заливают раствором молочнокислого кальция, тщательно перемешивают, добавляют аммиак и после растворения казеина раствор помещают на холод при температуре от 0 до 4°.

Техника. Для приготовления вытяжки 2 *г* свежевыделенных фекалий растирают в ступке с небольшим количеством кварцевого песка или измельченного стекла. Добавляют небольшими порциями при продолжающемся растирании 18 *мл* дистиллированной воды и оставляют стоять на полчаса. После этого смесь центрифугируют, надосадочную жидкость сливают и, если она имеет кислую реакцию на лакмус, нейтрализуют добавлением аммиака до pH 7,0.

Затем вытяжку дополнительно разбавляют водой с учетом объема использованного для нейтрализации аммиака. Если ожидают обнаружить низкое содержание энтерокиназы, вытяжку разбавляют вдвое (разведение материала 1 : 20), если высокое (более 200 единиц фермента в 1 *г*) — разбавляют в 10 раз (разведение материала 1 : 100), а иногда даже в 100 раз (разведение 1 : 1000).

При исследовании дуоденального сока (собранного в пробирки малыми порциями) отбирают и соединяют вместе лишь порции, обладающие характерными свойствами: слабощелочной реакцией на лакмус, золотисто-желтой или коричнево-желтой окраской и про-

зрачностью. В случае присутствия хлопьев слизи их отделяют центрифугированием. Дуоденальный сок разбавляют дистиллированной водой, например в соотношении 1 : 200 (при высоком содержании энтерокиназы) или меньше, и проводят дальнейшие процедуры, одинаковые при исследовании сока и вытяжек.

В 7—10 бюксах берут ряд разведений, так чтобы количество исследуемого материала убывало на $\frac{1}{3}$ в каждом последующем сосуде по сравнению с предыдущим. Для этого во все бюксы, кроме первого, наливают по 1 *мл* дистиллированной воды. Затем в первый наливают 1 *мл* разбавленной вытяжки (или разбавленного дуоденального сока), а во второй — 2 *мл* той же вытяжки. Путем двукратного набирания в пипетку и обратного выдувания вытяжку перемешивают с содержащейся во втором бюксе водой. 2 *мл* смеси из второго бюкса переносят в третий, где таким же образом перемешивают, снова переносят в следующий бюкс и т. д. Из последнего бюкса 2 *мл* смеси отбрасывают. Во все бюксы прибавляют по 2 капли раствора фосфатного буфера с pH 7,16 и по 0,03 *г* препарата трипсиногена.

Навески препарата по 0,03 *г* каждая в нужном количестве подготовляют еще до начала определения. Удобно пользоваться для этого торсионными весами. После добавления трипсиногена содержимое бюксов взбалтывают и помещают для активирования в термостат на 1 час при 37°. После этого во все сосуды быстро прибавляют по 0,5 *мл* 0,7 н. раствора аммиачного буфера с pH 8,9 и по 2 *мл* 5%-ного раствора казеина, содержащего кальций, взбалтывают, переставляют на нагретую в термостате подставку с темным дном и вновь инкубируют при 37° в течение 10 мин., после чего учитывают результат.

При надлежащем предварительном разведении материала казеин в нескольких бюксах с большим содержанием энтерокиназы оказывается переваренным, а в других — створоженным, что легко различимо невооруженным глазом.

Отмечают последнюю переваренную порцию, содержание энтерокиназы в которой равно одной условно принятой единице энтерокиназы, и путем простого расчета устанавливают содержание этого фермента в первоначально взятом исследуемом материале. Практически удобно пользоваться заранее составленными таблицами, указывающими количество единиц фермента в 1 *г* исследуемого материала при данном начальном разведении в зависимости от номера бюкса, содержащего последнюю переваренную порцию. Точность около 10%. Ниже приводится такая таблица для начального разведения 1 : 20 и 1 : 1000.

Ван Венруж [22] предложил метод обнаружения протеолитических ферментов на электрофореграммах. Метод применим в отношении тех ферментов, субстраты которых можно отличить от продуктов распада посредством некоторых характерных реакций осаждения определенными химическими реагентами. Так, например, можно установить локализацию протеолитических ферментов путем осаждения нерасщепленного субстрата — белка трихлоруксусной кисло-

Содержание энтерокиназы в 1 г материала

Начальное разведение	Номера последних порций с переваренным казеином									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 : 20	20	30	45	67	100	150	225	340	510	760
1 : 1000	1000	1500	2250	3400	5100	7600	11 400	17 100	25 700	38 500

той. Предложенный метод в основном является модификацией метода «сендвича», применяемого для обнаружения амилазы.

В простейшем варианте применяют засвеченную и проявленную фотографическую пластинку. В местах, где подействовал протеолитический фермент, зерна серебра отсутствуют ввиду переваривания нижележащего слоя желатины. Засвечивание фотопластинки производят экспозицией на дневном свету в течение нескольких минут, проявлять пластинку следует в обычном метолгидрохиноновом проявителе с добавлением карбоната калия, применение фиксажа излишне. После тщательного промывания и высушивания фотопластинка готова к употреблению.

Электрофоретическое разделение белкового экстракта, содержащего протеолитические ферменты, производят на агаре, нанесенном на предметное стекло. Поверхность электрофореграммы сушат фильтровальной бумагой и накладывают на фотопластинку слоем агара на слой желатины. Этот «сэндвич» инкубируют при 37° около 10 мин. (при 100%-ной влажности), пластинки разъединяют опустив их в воду, затем фотопластинку промывают водопроводной водой; светлые пятна, лишенные серебра, соответствуют локализации протеолитического фермента на электрофореграмме. Данных о проверке метода другими лабораториями пока не имеется.

Определение активности окситоциназы (ОТЦ) [23]

(пептидаза типа: КФ 3.4.4.8)

П р и н ц и п. Метод основан на измерении количества β-нафтиламина, освобождаемого под влиянием сыворотки из субстрата *L*-цистинил-ди-β-нафтиламида.

Р е а к т и в ы: 1) раствор субстрата приготовляют, растворяя 135 *мг* *L*-цистинил-ди-β-нафтиламида в 50 *мл* 0,012 н. раствора соляной кислоты, легко подогревая и затем доводя объем раствора водой до 100 *мл*; 2) вероналовый буфер с рН 7,9 : 68,9 *мл* 0,1 н. раствора вероналнатрия и 31,1 *мл* 0,1 н. раствора соляной кислоты разбавляют 50 *мл* воды; 3) 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты; 4) водный раствор дихлористоводородной соли *N*-(1-нафтил)-этилендиамина; 8) ацетон чистый для анализа; 9) раствор $NaNO_2$; 10) раствор сульфамата аммония.

Т е х н и к а. К 0,3 *мл* сыворотки прибавляют 0,45 *мл* воды и 1,5 *мл* веронолового буфера. Переносят по 0,75 *мл* этой смеси в две

центрифужные пробирки и в обе добавляют по 0,25 *мл* субстрата. Исследуемую пробу инкубируют в термостате в течение 4 час. при 37°, причем в контрольной пробе прерывают реакцию немедленно после добавления субстрата путем введения 1 *мл* раствора трихлоруксусной кислоты. Спустя 4 часа таким же образом прерывают реакцию в инкубируемой пробе. Обе пробы центрифугируют и отмеривают 1 *мл* надосадочной жидкости в колбочки Эрленмейера емкостью 50 *мл*. Добавляют 9 *мл* смеси, состоящей из 2 частей 0,36 н. раствора соляной кислоты и 1 части ацетона. Затем в темной комнате с красным светом добавляют в колбочки, через 3-минутные интервалы, 1 *мл* $NaNO_2$, 1 *мл* сульфамата аммония и, наконец, 1 *мл* *N*-(1-нафт ил)-этилендиамина, тщательно помешивая. Ставят на 4 часа для нинкубации при 37° и колориметрируют при 565 *ммк*, сравнивая с кодтрольными пробами. Количество β-нафтиламина находят по станоартной кривой, составленной в условиях метода при помощи чист го β-нафтиламина.

Активность фермента выражают числом *мг* β-нафтиламина, освобождаемого из субстрата под влиянием 100 *мл* сыворотки в течение 1 часа. Эту величину получают, умножая разность экстинкций на коэффициент 1,84.

Нормальная активность сыворотки крови у мужчин и небеременных женщин составляет 0,2. Точность метода около 10%.

Определение пептидаз [24]

(типа КФ 3.4.4.8)

Ацидиметрическое определение ди- и полипептидов

Пептидазы определяют косвенным путем, по количеству ди- и (или) полипептидов, образующихся при расщеплении белка под влиянием фермента.

Этот метод модифицирован; он позволяет получить данные о ферментативном гидролизе пептидов в широком диапазоне независимости различных субстратов.

Принцип. Аминокислоты, освобожденные при расщеплении пептидов, определяют ацидиметрически с тимолфталеином как индикатором. Основность одновременно освобождаемых при этом аминогрупп уменьшается при помощи высокопроцентного этанола, который применяют в качестве растворителя при титровании. Прирост кислотности за единицу времени служит критерием для активности фермента.

Вследствие различия в рН-оптимуме и активаторах у различных пептидаз необходимо подобрать буферы, активаторы и другие условия опыта (например, прединкубация активатора и субстрата) для определяемого фермента. Здесь описывается определение глицилглициндипептидазы в сыворотке, активированной Co^{2+}. Метод можно применить также для гомогенатов тканей различных органов. Оптимум рН для фермента сыворотки и эритроцитов лежит

при 7,6. Для оптимальной активности требуется добавление ионов кобальта. Другие двухвалентные ионы не влияют совсем или влияют незначительно. В то время как пролидазу надо вместе с марганцем прединкубировать в течение 2—3 час., глицилглициндипептидаза сразу же активируется после добавления кобальта. Насыщение субстрата достигается при 0,05 *М* глицилглицина. Для гидролиза субстрата необходима сравнительно длительная инкубация, начальную скорость реакции не определяют. Это — реакция первого порядка.

Реактивы: 1) субстратный раствор (0,125 *М* глицилглицина): 822 *мг* глицилглицина растворяют в 50 *мл* дистиллированной воды. Значение pH доводят до 7,8 при помощи 0,1 н. раствора едкого натрия; 2) вероналовый буфер (0,1 *М* раствор; pH 7,8): 2,06 *г* веронала натрия растворяют в дистиллированной воде, дополняя объем до 1000 *мл*; 66,2 *мл* этого раствора смешивают с 33,8 *мл* 0,1 н. раствора соляной кислоты. Контролируют значение pH; 3) сульфат кобальта (0,01 *М* раствор): 281 *мг* сульфата кобальта растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*; 4) спиртовый раствор едкого натра (0,01 н.): 2 *г* едкого натра (лепешки) встряхивают в колбе с 500 *мл* чистого 96%-ного спирта до растворения и оставляют стоять 24 часа. Осаждается тонкий осадок; прозрачный раствор над осадком декантируют. Из этого раствора ежедневно отбирают свежие 10 *мл* и разбавляют их алкоголем до 100 *мл* и устанавливают титр; 5) индикатор тимолфталеин (0,1%-ный раствор): 100 *мг* вещества растворяют в 100 *мл* 96%-ного спирта.

Стойкость реактивов. Глицилглицин. Субстратный раствор хранят в холодильнике при 4° и через 6—8 дней готовят заново. 0,1 н. алкогольный раствор едкого натра сравнительно более устойчив, если он герметически защищен от углекислоты воздуха. Буферный раствор хранят в холодильнике.

Техника. *Постановка опыта.* Используют свежую сыворотку. Активность фермента в сыворотке крови человека в противоположность активности в сыворотках некоторых животных (крыса, мышь) незначительна. При очень незначительной активности для титрования вместо 0,2 *мл* инкубированного раствора следует брать 0,4 *мл*. Затем для осаждения белков добавляют 3,6 *мл* алкоголя. Для получения большего расхода субстрата можно продлить инкубационное время еще на 4 часа. Все изменения принимают во внимание при вычислении.

Объем 2,5 *мл*; температура 37° (водяная баня). Последовательно в пробирку отмеряют пипеткой: 0,75 *мл* буферного раствора (2); 0,25 *мл* раствора сульфата кобальта (3); 1,00 *мл* раствора субстрата; поддерживают равномерную температуру приблизительно 10 мин. Реакция начинается с добавления в пробирку 0,50 *мл* сыворотки. Смешивают. Отмечают время. Сразу же (0 мин.) берут 0,2 *мл* пробы (нулевое значение); следующие пробы берут по 0,2 *мл* через 30, 60, 120 и больше минут.

В центрифужную пробирку емкостью 10 *мл* отмеряют пипеткой 1,8 *мл* 96%-ного этанола и 0,2 *мл* пробы (из ферментативной смеси). Приблизительно 10 мин. центрифугируют [1]. Надосадочную жидкость сливают в эрленмейеровскую колбу емкостью 50 *мл*. Осадок промывают один раз небольшим количеством 96%-ного этанола и эту жидкость тоже переносят в эрленмейеровскую колбу. Добавляют 3 капли раствора тимолфталеина (5) и титруют 0,01 н. спиртовым раствором едкого натра до изменения окраски на голубую. Изменение окраски не очень резкое.

Вычисление. Активность фермента пропорциональна количеству освобожденных аминокислот, которое пропорционально расходу едкого натра при титровании (разница между нулевым значением и пробой).

Активность фермента выражают либо как процент гидролиза субстрата за единицу времени (часы) или, лучше, определяют ее при помощи константы скорости реакции K_1 (реакция первого порядка):

$$K_1 = \frac{1}{t\,[\text{мин.}]} \cdot \log \frac{100}{100 - (\%\ \text{гидролиза})}\ .$$

При данных условиях полному гидролизу соответствует расход 12,5 *мл* 0,01 н. раствора едкого натра для всего количества (2,5 *мл*) смеси; итак, для 0,2 *мл* пробы 1,0 *мл* 0,01 н. раствора едкого натра. Процент гидролиза = (расход 0,01 н. раствора NaOH [*мл*])·100.

Пример. Анализируют сыворотку крови человека при гепатите. Берут 0,2 *мл* пробы ферментативной смеси.

Результаты титрования: 0 мин. 1,24 *мл* 0,01 н. раствора NaOH; 60 мин. 1,56 *мл* 0,01 н. раствора NaOH.

Прирост кислотности: 0,32 *мл* 0,01 н. раствора NaOH; % гидролиза: 32.

$$K_1 = \frac{1}{60} \cdot \log \frac{100}{100 - 32} = \frac{1}{60} \cdot \log 1{,}47 = \frac{1}{60} \cdot 0{,}269 \approx 3 \cdot 10^{-3}\ \text{мин}^{-1}.$$

При соблюдении всех условий опыта точность метода может быть доведена до 3—5%.

Определение карбоксипептидазы [25]

(КФ А — 3.4.2.1; В — 3.4.2.2; дрожжевая — 3.4.2.3)

Карбоксипептидаза — фермент, содержащий сульфгидрильную группу (—SH—). Он имеется в поджелудочной железе в высоких концентрациях в виде неактивного профермента, который может активироваться автолитически или трипсином. Высказываются мнения о существовании различных карбоксипептидаз поджелудочной железы в почках и молоке. Для измерения активности карбоксипептидазы нужно использовать субстрат с конечной карбоксиль-

[1] Фильтрация раствора не пригодна: большая потеря этанола из-за испарения.

ной группой. Такого рода специфическим субстратом считается нафтоксикарбонилфенилаланин.

П р и н ц и п. Нафтоксикарбонилфенилаланин расщепляется карбоксипептидазой на фенилаланин и нафтоксикарбоновую кислоту. Последняя распадается спонтанно на β-нафтол и углекислый газ. После соединения с тетраазотированным *о*-дианизидином β-нафтол можно определять колориметрически как азокраситель.

Оптимум pH лежит между 7,4 и 7,8. При 6.10^{-4} *M* концентрации субстрата нафтолоксикарбонил-*L*-фенилаланина реакция в первые 30 мин. протекает линейно, расход субстрата приблизительно составляет 10%. При 2.10^{-4} *M* концентрации субстрата, применяемых в старых методах, не существует линейности между расходом субстрата и количеством фермента.

Для достижения оптимальной активности карбоксипептидазы в дуоденальном соке требуются ионы кальция (0,005 *M*). Кристаллическую карбоксипептидазу количественно находят только после добавления ионов кальция.

Р е а к т и в ы: 1) субстратный раствор (приблизительно $3 \cdot 10^{-3}$ *M* раствор нафтоксикарбонил-*L*-фенилаланина): 20 *мг* рацемата растворяют в 10 *мл* чистого метанола. Ежедневно готовят свежим; 2) трис-буфер (0,05 *M* раствор; pH 7,8): 6,08 *г* трис-гидроксиметиламинометана растворяют в дистиллированной воде, объем доводят до 250 *мл*, добавляют 342 *мл* 0,1 н. раствора соляной кислоты, дополняют объем раствора до 1000 *мл* дистиллированной водой. Значение pH контролируют и соответственно исправляют; 3) хлорид кальция (0,25 *M* раствор): 5,48 *г* $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ растворяют в дистиллированной воде, объем доводят до 100 *мл*; 4) реактив красителя (0,4%-ный раствор голубой соли): 200 *мг* голубой соли B („Эхтблау") растворяют в 50 *мл* дистиллированной воды. Ежедневно готовят свежим; 5) β-нафтол (50 *мкг/мл*): 50 *мг* β-нафтола растворяют приблизительно в 100 *мл* метанола и доводят объем до 1000 *мл* дистиллированной водой; 6) 70%-ный раствор хлорной кислоты (уд. вес 1,67). Кроме первого и четвертого растворов, которые готовят ежедневно свежими, остальные вещества и растворы практически неограниченно устойчивы.

Т е х н и к а. Описанный далее метод предназначается для дуоденального сока. По этому методу можно определитть карбоксипептидазу и в поджелудочной железе.

Исследуемый материал. Дуоденальный сок перед измерением разбавляют буфером 1 : 10. Для инактивирования (пустой опыт, см. ниже) фермента применение нагревания все же недостаточно. Используют 0,1 *мг* кристаллического трипсина на 1 *мл* пробы; это инактивирование длится приблизительно 3 мин.

Постановка опыта. К каждой серии опыта ставят пустой опыт с инактивированной пробой: разбавленную (см. выше) пробу нагревают в кипящей водяной бане 5 мин. Экстинкция пустого опыта должна лежать между 0,100 и 0,500, в противном случае измеряют повторно с большей (0,5 *мл*) или меньшей (0,1 *мл*) пробой.

В центрифужную пробирку емкостью 25 *мл* последовательно отмеряют пипеткой: 0,2 *мл* разведенного дуоденального сока; 0,1 *мл* раствора хлорида кальция и 4,7 *мл* буфера (2). Смесь нагревают приблизительно 10 мин. на водяной бане при 37°, добавляют 0,5 *мл* субстрата, перемешивают, оставляют в бане и отмечают время (общий объем жидкости в пробирке 5,5 *мл*). Точно через 20 мин. добавляют 1,0 *мл* раствора красителя (4), перемешивают, включают секундомер. Через 1 мин. добавляют 1,0 *мл* 70%-ного раствора хлорной кислоты. В течение 1—2 мин. выпадает незначительное количество белка. Встряхивают с 10,0 *мл* уксусноэтилового эфира. Для разделения фаз центрифугируют несколько минут. Верхний слой осторожно декантируют, для обезвоживания добавляют на кончике шпателя сульфат натрия (безводный); раствор обезвоженного красителя колориметрируют при 546 *ммк* против кюветы (толщина слоя 1 *см*) с уксусноэтиловым эфиром.

Калибровочная кривая. 0,1—1,0 *мл* раствора β-нафтола (соответствующих 5—50 *мкг*) дополняют до 5,5 *мл* раствором буфера, добавляют по 1 *мл* красителя, нагревают на водяной бане при 37° и работают дальше, как описано выше. Экстинкцию (ордината) откладывают против концентрации β-нафтола (*мкг*) (абсцисса). Экстинкции (546 *ммк*) 1,000 соответствует 36,5 *мкг* β-нафтола.

Вычисление. Активность фермента определяют по количеству освобожденного β-нафтола за единицу времени: *мкг* β-нафтол/*мин·мл* пробы. Вычисляют разность экстинкций основного и пустого опытов; соответствующие этому значению количества *мкг* β-нафтола находят из калибровочной кривой (см. выше). Для пересчета на 1 *мл* сыворотки умножают на $50\left(\frac{1}{0,2}\cdot 10\right)$, для пересчета на 1 мин. время реакции делят на 20.

Мкмоли β-нафтола в пробе·2,5=*мкмолям* β-нафтола/*мин·мл*. Активность фермента в дуоденальном соке лежит между 2,1 и 51 *мкмолем* β-нафтола/*мин·мл*.

Пример. Берут 0,2 *мл* 1 : 10 разведенного сока. Измеряют экстинкции после 20 мин. инкубации:

Основной опыт	0,257
Пустой опыт	0,178
Разница	0,079

По калибровочной кривой этому соответствует 2,85 *мкг* β-нафтола 2,85·2,5 = 7,1 *мкг* β-нафтола/*мин·мл*.

При соблюдении всех условий опыта точность может быть доведена до 3—5%.

Определение активности γ-глютамилтранспептидазы (ГГТП) [26] (типа КФ 3.4.4.8)

Принцип. Метод состоит в колориметрическом определении количества α-аминопропионитрила (АПН), освобождаемого из субстрата γ-*DL*-глутамил-α-аминопропионитрила (γ-глу-АПН), под влиянием фермента.

Реактивы: 1) раствор субстрата: 100 *мг* γ-глу-АПН растворяют в 10 *мл* H_2O; 2) буфер трис 0,1 *М* раствор с pH 8,8; 3) 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты; 4) мышьяковистокислый натрий: 2 *г* мышьяковистого ангидрида растворяют при нагревании в 100 *мл* 0,1 н. раствора едкого натра и охлаждают до комнатной температуры; 5) дистиллированная вода, насыщенная бромом; 6) раствор пиридина: 120 *мл* пиридина смешивают с 80 *мл* воды и добавляют, охлаждая, 20 *мл* концентрированной соляной кислоты; 7) раствор хлористоводородного бензидина: 1,8 *г* чистого бензидина растворяют, подогревая на водяной бане, в 50 *мл* 0,5 н. раствора соляной кислоты и охлаждают (употреблять свежий); 8) смесь бензидина и пиридина: перед самым опытом смешивают 1 объем хлористоводородного бензидина с 3 объемами раствора пиридина; 9) 0,01 *М* раствор $HgCl_2$; 10) 0,65 *г* KCN (свежий, для анализа, наивысшей чистоты) растворяют в 1000 *мл* 1 н. раствора едкого натра. Перед самым употреблением раствор разбавляют точно до 0,0001 *М* раствора KCN.

Техника. В центрифужную пробирку отмеряют 0,25 *мл* буфера трис и 0,2 *мл* субстрата. Подогревают до 37° на водяной бане и начинают реакцию, добавляя 0,25 *мл* сыворотки. Через 120 мин. инкубации при 37° прерывают реакцию добавлением 1,3 *мл* 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Одновременно готовят контрольную пробу с сывороткой, прибавляемой после трихлоруксусной кислоты. Отделяют белковый осадок в центрифуге и переносят 1 *мл* прозрачной жидкости в пробирку с притертой стеклянной пробкой емкостью 10 *мл* для определения АПН. Добавляют 0,1 *мл* 0,01 *М* раствора $HgCl_2$ и 0,25 *мл* насыщенной бромной воды, закупоривают и ставят в водяную баню с температурой 37° на 3 часа. По истечении этого срока охлаждают пробирки, открывают избыток брома прибавлением 0,25 *мл* мышьяковистокислого натрия. Струей воздуха, продутого через жидкость, удаляют пары брома из пробирки. Прибавляют 3,4 *мл* смеси пиридина и бензидина, перемешивают и ставят на 20 мин., до появления полного окрашивания. Колориметрируют пробы при 530 *ммк*, сравнивая с контролем. Количество освобождаемого во время ферментативной реакции АПН находят по стандартной кривой, составляемой при помощи KCN, так как было доказано, что чистый АПН дает в описанной реакции такие же величины, как равновесное количество KCN.

Для получения данных, требуемых для построения стандартной кривой, отмеряют в ряд пробирок от 0,1 до 0,5 *мл* 0,0001 *М* раствора KCN, доводят их водой до объема 0,5 *мл* и прибавляют 0,5 *мл* 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Затем добавляют 0,25 *мл* бромной воды и спустя короткое время устраняют избыток брома при помощи 0,25 *мл* арсенита. Вызывают цветную реакцию смесью пиридина и бензидина, как указывалось выше. Колориметрируют при 530 *ммк*.

Активность фермента выражают числом микромолей образующе-

гося АПН в 100 *мл* сыворотки, в заданных условиях. В связи с неустойчивостью АПН в условиях опыта и его частичным разложением вводят корректирующий коэффициент 1,14. Активность равна 800 × *мкмоли* KCN (найденные по стандартной кривой) × 1,14.

Активность фермента в сыворотке здоровых лиц составляет в среднем 11 единиц. При хранении в течение 2 дней при комнатной температуре или в течение недели при температуре 4° активность фермента в сыворотке не изменяется. Нагревание сыворотки в течение 5 мин. при 65° уничтожает активность. Оптимум pH для данного субстрата находится между 8,5 и 8,7.

Точность метода порядка 10%.

Определение активности трипептидазы [27]

(типа КФ 3.4.4.8)

П р и н ц и п. Активность фермента определяют с глицилглицилглицином (ГГГ) в качестве субстрата, причем оптимум pH для этого пептида равняется 6,8. Принцип метода состоит в измерении разницы интенсивности окрашивания между медным комплексом ГГГ, с одной стороны, и медью и комплексами продуктов гидролиза этого трипептида — с другой.

Р е а к т и в ы: 1) 0,05 *M* раствор ГГГ в 0,05 *M* вероналовом буферном растворе pH 6,8 служит субстратом; 2) суспензия фосфорнокислой меди, приготовленная по [28]. Перед употреблением смешивают 2 части раствора хлористой меди с 1 частью трехзамещенного фосфата натрия; 3) боратнонатриевый буфер: 75,6 *г* $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ растворяют в 2 *л* воды; 4) депротеинизирующая смесь: смешивают равные части 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты и метанола; 5) 1 н. раствор HCl.

Т е х н и к а. 0,8 *мл* сыворотки доводят до pH 1 н. раствором HCl (0,05 *мл*) и дополняют до объема 1 *мл*. В две пробирки с притертыми стеклянными пробками отмеряют по 0,25 *мл* субстрата и подогревают на водяной бане до 38°. В одной из пробирок начинают реакцию, приливая 0,25 *мл* сыворотки. По окончании инкубации прерывают реакцию, добавляя в обе пробирки смесь метанола и раствора трихлоруксусной кислоты в количестве 0,5 *мл*. Затем в контрольную пробирку прибавляют 0,25 *мл* сыворотки. Перемешивают и ставят в водяную баню на 5 мин. Затем добавляют в каждую пробирку по 3 *мл* раствора бората и 1 *мл* суспензии фосфата меди, тщательно перемешанной. Перемешивают содержимое, три раза переворачивая пробирку, ставят на 5 мин. в водяную баню и повторно перемешивают, переворачивая пробирку. Центрифугируют пробирку со скоростью 2000 *об/мин* и колориметрируют надосадочную жидкость против контрольной пробы с фильтром S_{53} (530 *ммк*) при толщине слоя в 2 *см*. Разность экстинкций *E* инкубированной (опытной) и контрольной проб позволяет определить процент гидролизованного субстрата при помощи соответствую-

щей стандартной кривой. Стандартную кривую составляют при тех же условиях, при которых проводилась ферментативная инкубация, причем смешивают в разных пропорциях — 1 : 1 : 1; 1 : 2 : 3; 1 : 3 : 4 (соответственно разной степени гидролиза субстрата) раствор 0,05 *M* глицилглицилглицина и 0,05 *M* растворы глицилглицина и глицина. Получаемое графическое изображение зависимости *E* от процента разложенного субстрата представляет собой прямую, пока гидролиз не достигнет 25% ГГГ. Активность дипептидазы не препятствует определению, так как спектр поглощения и интенсивность окрашивания комплексов меди с глицилглицином почти те же, что и для комплексов меди с глицином, образующимся при гидролизе дипептида. Точность метода 10%.

Определение активности пептидаз [29]

П р и н ц и п. Этот метод использует способ определения аминокислот при помощи реактива с нингидрином. Количество разложенного субстрата находят по стандартной кривой, составленной для смесей разного количества субстрата и продуктов его гидролиза. Экстинкция этих смесей (соответствующих разным степеням гидролиза субстрата), колориметрируемая против экстинкции, полученной при начальной концентрации субстрата (0% гидролиза), пропорциональна степени гидролиза субстрата.

Т е х н и к а. Реактив с нингидрином должен быть свежеприготовленным. Для определения степени гидролиза субстрата пробы инкубационной смеси вливают в 1%-ный раствор пикриновой кислоты, тормозящей дальнейшую ферментативную реакцию. Инкубационная смесь содержит буфер, сыворотку или другой источник фермента и субстрат, конечная концентрация которого должна составлять 25 *мкмолей* в 1 *мл*. Инкубационную смесь готовят в ледяной бане. В нулевой момент берут 0,2 *мл* смеси в посуду с 4,8 *мл* 1%-ного раствора пикриновой кислоты для получения начальной экстинкции смеси. Затем переносят инкубационную смесь в водяную баню с температурой 37° (небольшая ошибка за счет выравнивания температур), и после определенных сроков инкубации (20 мин.) берут по 0,2 *мл* смеси в посуду с 4,8 *мл* 1%-ного раствора пикриновой кислоты. Таким образом, 1 *мкмоль* субстрата содержится, после осаждения белка, в 1 *мл*. Пробы центрифугируют и с тремя порциями по 0,2 *мл* прозрачного раствора (что соответствует 0,2 *мкмоля* субстрата), проводят параллельные реакции с нингидрином. Одновременно готовят по 3 слепых пробы с реактивами и 0,2 *мл* воды, 3 пробы стандарта со степенью проведенного в них гидролиза, равной 40%. Ко всем пробам добавляют по 1 *мл* реактива с нингидрином и подогревают в закупоренных (пробки с отверстием) пробирках 20 мин. в кипящей водяной бане. Охлаждают и разбавляют до 10 *мл* смесью спирта с водой в равных частях. Колориметрируют при 570 *ммк*. Пробы, содержащие стандарт с 0% гидролиза и 0-минутную инкубационную смесь, колориметри-

руют против средней величины слепых проб с водой. Затем отсчитывают пробы со стандартом 40% гидролиза против средней величины стандартной пробы с 0% гидролиза, и, наконец, колориметрируют остальные ферментативные пробы против 0-минутной инкубационной смеси. Процент гидролиза субстрата вычисляют, умножая среднюю экстинкцию каждой пробы на константу *K*, получаемую путем деления 40 на среднюю экстинкцию стандарта с 40% гидролиза. Точность метода 10—15%.

Определение аденозиндезаминазы [30]
(КФ 3.5.4.4)

П р и н ц и п. Методика заключается в измерении при помощи реактива Несслера количества аммиака, освободившегося во время ферментативной реакции.

Р е а к т и в ы (все реактивы готовят на воде, лишенной CO_2 путем кипячения): 1) 0,4%-ный раствор аденозина: растворяют препарат (аденозин) в горячей воде; 2) фосфатный буфер, содержащий 7,8 *г* монокалиевого фосфата и 17,9 *г* динатриевого фосфата · $7H_2O$ в 100 *мл* воды; 3) 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты; 4) раствор Фелинга II, приготовленный путем растворения 5 *г* едкого натра и 17 *г* тартрата натрия-калия (сегнетовой соли) в 100 *мл* воды; 5) 2%-ный раствор гуммиарабика; 6) реактив Несслера: 10,0 *г* HgJ_2 и 8,0 *г* йодида калия растворяют в 10 *мл* дистиллированной воды, смешивают с 25,0 *мл* насыщенного раствора едкого натра и прибавляют 65 *мл* воды. В течение нескольких дней перед употреблением хранить в герметически закрытой бутылке. Для анализа пользуются только прозрачной жидкостью над осадком.

Т е х н и к а. В пробирке смешивают 2 *мл* сыворотки, 0,9 *мл* раствора аденозина и 0,1 *мл* фосфатного буфера. Из этой смеси немедленно переносят 1 *мл* в 2 *мл* трихлоруксусной кислоты в качестве слепой пробы. Остальную часть смеси инкубируют в течение 1 часа на водяной бане при 38°. Реакцию прерывают, перенося 1 *мл* инкубированной смеси в 2 *мл* трихлоруксусной кислоты. Пробы центрифугируют и 1 *мл* прозрачной жидкости над белковым осадком переносят в чистые пробирки, прибавляют 5 *мл* раствора Фелинга II, 1 *мл* раствора гуммиарабика и 2,5 *мл* дистиллированной воды, свободной от CO_2. Затем прибавляют 0,5 *мл* реактива Несслера и точно через 60 *сек*. сравнивают со слепой пробой при фильтре S_{43} (430 *ммк*). Активность фермента выражается в граммах азота аммиака, освобожденного в течение 1 часа 1 *мл* сыворотки в приведенных условиях. Точность метода 5%.

Определение аргиназы [31]

П р и н ц и п. Метод определения активности фермента, разработанный для определения аргиназы кожи, основан на установлении при помощи реакции с ксантгидролом количества мочевины, образующейся в результате действия аргиназы.

Р е а к т и в ы: 1) глициновый буферный раствор (pH 9,7); 2) 0,25%-ный водный раствор монохлорида аргинина; 3) 0,5 н. раствор сульфата железа; 4) 0,02%-ный раствор цистеина; 5) 1 н. раствор едкого натра; 6) реактив Танре; приготовление см. [31].

Т е х н и к а. Энзиматические препараты приготовляют следующим образом: кожу трупа человека (обычно через 12—20 час. после смерти) освобождают от жирового слоя, промывают водой и измельчают. Кусочки кожи (1—2 *г*) заливают таким количеством 1%-ного раствора аммиака, чтобы они свободно плавали в жидкости, и оставляют при комнатной температуре на 1 час. После этого раствор аммиака сливают, а кусочки кожи промывают несколько раз дистиллированной водой, слегка подсушивают между листами фильтровальной бумаги и отделяют эпидермис от дермы. Затем эпидермис растирают в ступке, а дерму измельчают ножницами. При большом количестве дермы ее пропускают несколько раз через мясорубку. Измельченные таким образом препараты эпидермиса или дермы обрабатывают в ступке два раза 5—6-кратным количеством ацетона, затем ацетоном пополам с эфиром, и , наконец, два раза эфиром с отсасыванием на бюхнеровской воронке.

Полученные препараты сушат на воздухе между листами фильтровальной бумаги. Сухой порошок эпидермиса отсеивают от грубых частиц, а дерму растирают в ступке на более мелкие кусочки. Кожу кроликов, крыс и мышей предварительно освобождают от шерсти и затем обрабатывают тем же способом.

Для определения активности аргиназы поступают следующим образом. В конические колбочки отвешивают 40 *мг* препарата эпидермиса или 500 *мг* дермы. Добавляют 5 *мл* глицинового буферного раствора (pH 9,7), 10 *мл* 0,25%-ного водного раствора монохлорида аргинина и 0,5 *мл* 0,5 н. раствора $FeSO_4$ + 2 *мл* раствора цистеина (концентрация 20 *мг*%), нейтрализованного едким натром. Смесь ставят в термостат на 6 час. при 37°. Затем к содержимому колбы прибавляют 3 *мл* реактива Танре. Осадок отфильтровывают и в 15 *мл* фильтрата определяют мочевину фотометрическим ксантгидрольным методом.

Для удобства сравнения активность аргиназы выражают в условных аргиназных единицах (А. Е.) на 1 *г* сухого препарата. За А. Е. принято количество аргиназы, дающее 0,06 *мг* мочевины за 6 час. при 37° в реакционной смеси, содержащей 10 *мл* 0,25%-ного раствора монохлорида аргинина, 0,5 *мл* 0,1%-ного раствора $KMnO_4$ и 5 *мл* глицинового буфера (pH 9,7).

Определение аргиназы и трансамидиназы [32]
(аргиназа: КФ 3.5.3.1)

П р и н ц и п. Для определения активности аргиназы в гомогенатах тканей применяют метод Гинберга, причем образующуюся мочевину определяют по методу В. Н. Ореховича и А. А. Тустановского (см. [6], стр. 423). Первоначальная методика была видоизменена в отношении активирования реакции.

Техника. Гомогенат почек (1 часть ткани + 4 части ледяной дистиллированной воды) после приготовления не разбавляют. Гомогенат печени разбавляют дистиллированной водой в отношении 1 : 20. Для активирования аргиназы используют Mn^{2+}. Из полученных таким способом гомогенатов берут порции по 2 *мл*, прибавляют к ним по 2 *мл* 0,1 *М* раствора $MnCl_2$ и после размешивания оставляют на 1 час в термостате при 40°. Для проведения ферментативной реакции в стеклянные пробирки емкостью 10 *мл* вводят 2,9 *мл* H_2O, 1,0 *мл* 0,1 *М* глицинового буферного раствора (pH 9,6 при 20°, pH 9,2 при 40°), содержащего 4,2 *мг* аргинина (чтобы конечная концентрация аргинина составляла 0,005 *М* или 105 *мг%*), и 0,1 *мл* гомогената, содержащего активированный фермент. Смесь инкубируют при 40° в течение 15 мин. Ферментативную реакцию прекращают прибавлением 1 *мл* 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Затем раствор фильтруют и в прозрачном фильтрате определяют мочевину. Для этой цели в пробирку емкостью 10 *мл* вводят 0,2 *мл* фильтрата, 0,6 *мл* 85%-ной фосфорной кислоты, на 100 *мл* которой прибавляют 1 *мл* 0,18%-ного раствора азотнокислого натрия, 0,07 *мл* 5%-ного водного раствора диацетилмоноксима и 0,14 *мл* 0,2%-ного раствора триптофана. После 5-минутного нагревания на кипящей водяной бане развивается розовое или красное окрашивание, интенсивность которого, после добавления 4 *мл* 85%-ной фосфорной кислоты, измеряют на спектрофотометре против воды при длине волны 500 *ммк*. При каждом определении одновременно измеряют экстинкцию растворов мочевины известной концентрации. Активность аргиназы выражают в микрограммах мочевины, образованной 1 *мг* ткани за 15 мин. По найденной экстинкции отсчитывают на калибровочной кривой концентрацию мочевины (в *мг%*), из этой величины вычитают величину, полученную в контрольном опыте; найденный результат умножают для печени на 100, а для почек на 5, принимая во внимание различную концентрацию гомогенатов.

Определение трансамидиназы осуществляют по методу Шорма, Шебесты и Турского [32], видоизмененному для работы с малыми количествами тканей. Инкубацию производят в общем объеме 1 *мл* с содержанием приблизительно $\frac{1}{6}$ *г* сырого веса почек; гомогенат после окончания инкубации центрифугируют. Из прозрачного центрифугата используют 0,05 *мл* (в контрольных опытах 0,1 *мл*) для хроматографического определения гликоциамина. При каждом определении цветную реакцию проводят также и с аргинином и гликоциамином в известных концентрациях; величины опытных данных отсчитывают на полученных для аргинина и гликоциамина калибровочных кривых. Вычитанием соответствующих величин, полученных в контрольном опыте, находят величины, выражающие (в *мг%*) количество аргинина и гликоциамина, найденные в безбелковом фильтрате после инкубации. Для сравнения обеих величин найденные данные перечисляют на процент убыли прибав-

ленного аргинина. Принимая, что из 1 *М* аргинина получается 1 *М* гликоциамина, количество образовавшегося гликоциамина после умножения на соответствующие молекулярные веса выражают в процентах потребления аргинина.

При соблюдении всех условий опыта точность метода может быть доведена до 3—5%.

Определение гистидазы и уроканиназы [33]

Гистидаза (гистидин-аммиак-лиаза, КФ 4.3.1.3)

П р и н ц и п. Метод основан на спектрофотометрическом определении уроканиновой кислоты, образующейся при ферментативном дезаминировании гистидина.

Р е а к т и в ы: см. Техника.

Т е х н и к а. Авторы рекомендуют проводить анализ следующим образом: проба содержала 0,5 *мл* сыворотки крови, 0,1 *мл* 0,1 *М* раствора гистидина, 0,1 *мл* 0,05 *М* раствора восстановленного глютатиона и 2,3 *мл* 0,1 *М* фосфатного буферного раствора pH 9,2. В контрольной пробе гистидин отсутствовал. Пробы при постоянном перемешивании инкубировали в аппарате Варбурга в течение 2 час. при 37°, после чего белки осаждали 1,5 *мл* хлорной кислоты (2,1 н. раствор). Осадок удаляли центрифугированием при 3500 *об/мин*. Хлорную кислоту из надосадочной жидкости удаляли добавлением 7 н. раствора KOH и доводили pH до 8,0. К 1 *мл* пробы добавляли 3 *мл* 0,1 *М* фосфатного буферного раствора pH 8,0 и определяли интенсивность поглощения при 277 *ммк* в спектрофотометре СФ-4 против контроля. Активность гистидазы выражали в условных единицах; одна условная единица равна количеству *мкмолей* уроканиновой кислоты, образовавшейся за 2 часа инкубации, в расчете на 1 *мл* сыворотки крови.

Уроканиназную активность в сыворотке крови определяют путем измерения понижения оптической плотности растворов вследствие распада уроканиновой кислоты. Пробу, содержащую 0,1—0,3 *мл* 0,2 *М* фосфатного буферного раствора (pH 7,4), 0,5 *мл* сыворотки крови, 0,1 *мл* 0,001 *М* раствора уроканата натрия, доводили водой до объема 2,5 *мл*. В контрольную пробу уроканат натрия не добавляли. Пробы при постоянном перемешивании инкубировали в приборе Варбурга в течение 1—4 час. при 37°, после чего белки осаждали 0,5 *мл* 3 *М* ацетатного буферного раствора (pH 4,8) с 3-минутным нагреванием на кипящей водяной бане. Осадок удаляли центрифугированием при 3500 *об/мин* и измеряли оптическую плотность проб против контроля при 267 *ммк* в спектрофотометре СФ-4. Активность уроканиназы выражали в условных единицах: одна условная единица равна количеству микромолей, умноженному на 10, уроканиновой кислоты, разложившейся за 1 час инкубации в расчете на 1 *мл* сыворотки крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Hoffmann E.* u. *Hoffmann J.* Bioch. Z., 1953, **324**, 397.
2. *Fischman W.* et al. J. Biol. Chem., 1948, **173**, 449.
3. *Pellegrino C.* a. *Villani G.* Bioch. J., 1955, **62**, 235.
4. *Verity M.* et al. Arch. Bioch. Biophys., 1964, **106**, 386.
5. *Henry R.* a. *Chiamori N.* Clin. Chem., 1960, **6**,434.
6. *Асатиани В. С.* Биохимическая фотометрия. М., Изд-во АН СССР, 1960, стр. 464.
7. *Асатиани В. С.*, см. [6], стр. 233.
8. *Асатиани В. С.*, см. [6], стр. 235.
9. *Fingerhut B.* et al. Clin. Chem., 1965, **11**, 862.
10. *Krautman B.* Amer. J. Clin. Path., Techn. Suppl. I, 1941,**5**, 67.
11. *Асатиани В. С.*, см. [6], стр. 463.
12. *Hollander F.* Gastroenterology, 1957, **33**, 659.
13. *Туголуков В. Н.* Современные методы функциональной диагностики и т. д. М., изд-во «Медицина», 1965, 104.
14. *Туголуков В. Н.*, см. [13], стр. 107.
15. *Туголуков В. Н.*, см. [13], стр. 110.
16. *Rick W.* В кн. Bergmeyer H. Methoden der enzymatischen Analyse. Weinheim, 1962, S. 819.
17. *Rick W.*, см. [16], стр. 807.
18. *Vaarvang H.* Acta Endocrin, 1959, **30**, 285.
19. *Rick W.*, см. [16], S. 831.
20. *Blackwood C.* et al. Anal. Bioch., 1965, **12**, 128.
21. *Шлыгин Г. К.* Биохимия, 1950, **15**, 509.
22. *Van Venrooj W.* Clin. Chim. Acta, 1965, **11**, 482.
23. Müller-Hartburg W. et al. Arch. Gynaek., 1959, **191**, 442.
24. *Rick W.*, см. [16].
25. *Rick W.*, см. [16], стр. 840.
26. *Szewczuk A.* a. *Orlowski M.* Chin. Chim. Acta, 1960, **5**, 680.
27. *Haschen R.* Clin. Chim. Acta, 1961, **6**, 316.
28. *Spies J.* et al. J. Biol. Chem., 1951, **191**, 787.
2. *Schwartz T.* a. *Engel F.* J. Biol. Chem., 1950, **184**, 197.
90. *Штрауб Ф.* Биохимия, 1957, **22**, 118.
31. *Мардашев С. Р.* и Семина Л. А. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1948, **6**, 441.
32. *Шорм Т. А.* и *Швейцир Н. И.* Биохимия, 1955, **20**, 45.
33. *Буробин В. А.* Вопросы мед. химии, 1964, **6**, 627.

ГЛАВА XV

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОСФОРИЛАЗ, ТРАНСФЕРАЗ

Определение фосфорилазы [1]

Принцип. Метод основан на фотометрическом определении активности фермента по количеству отщепляемого фосфора.

Реактивы. Для приготовления субстрата в колбу отмеряют 1 *мл* 4,36%-ного (0,3 *М*) раствора солянокислого цистеина; сюда же добавляют 39 *мл* 1%-ного раствора двунатриевой соли глицерофосфата. Полученный таким образом буферный раствор (рН 6,8) тщательно размешивают; 1 *мл* раствора отмеряют в другую колбочку (или пробирку); сюда же приливают 2 *мл* 2%-ного раствора гликогена и 1 *мл* 0,064 *М* нейтрализованного раствора глюкозо-1-фосфата (не содержащего примеси неорганического фосфата). Гликоген играет роль затравки ферментативной реакции.

Техника. Ферментативное расщепление проводят следующим образом: смесь нагревают на водяной бане до 30°, добавляют 0,2 *мл* соответственным образом разведенного раствора фермента (приготовление препарата кристаллической фосфорилазы из мышц см. Самнер и Сомерс), размешивают и оставляют в течение 5 мин. на водяной бане при 30°. По истечении этого времени к смеси прибавляют 1 *мл* 5%-ной трихлоруксусной кислоты для прекращения ферментативной реакции и в аликвотной части раствора сразу производят определение содержания неорганического фосфора фотометрическим путем (см. [6], стр. 654). Лучше всего пользоваться фотоэлектрическим колориметром, чтобы делать отсчеты возможно скорее (во избежение заметного гидролиза глюкозо-1-фосфата кислотой).

Зная, что при рН 6,8 ферментативное расщепление глюкозо-1-фосфата к моменту равновесия составляет 80% и определив количество фосфора (x), отщепляемого в течение 5 мин. при 30° (в % от общего кислотнорасщепляемого фосфора), единицы фосфорилазной активности высчитывают, пользуясь формулой

$$200\frac{80}{80-x}.$$

Если хотят определить степень чистоты фермента, ее выражают в единицах фосфорилазной активности для 4 *мл* опытной смеси, деля их на содержание белка (в *мг*) в 1 *мл* этой же смеси (содержание белка можно определять фотометрическим путем, пользуясь для этого биуретовой реакцией).

Определение галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы [2] (КФ 2.7.7.10)

Фермент катализирует реакцию[1].

$$\text{Га-1-Ф} + \text{УДФГ} \rightleftarrows \text{УДФГа} + \text{Г-1-Ф}. \quad (1)$$

Принцип. По реакции (1) образующийся глюкозо-1-фосфат фосфоглюкомутазой (ФГлюМ) переводится в глюкозо-6-фосфат, который с никотинамидадениндинуклеотидфосфатом (НАДФ) и дегидрогеназой глюкозо-6-фосфата (ДГ-Г-6Ф) окисляется в 6-фосфоглюконат, 6-ФГ.

$$\text{Г-1-Ф} \underset{}{\overset{\text{ФГлюМ}}{\rightleftarrows}} \text{Г-6-Ф}; \quad (2)$$

$$\text{Г-6-Ф} + \text{НАДФ} \overset{\text{ДГГ-6Ф}}{\rightleftarrows} \text{6-ФГ} + \text{НАДФ-Н} + \text{H}^+ \quad (3)$$

На 1 *мкмоль* гексозофосфата образуется 1 *мкмоль* НАДФ-H_2. Измеряют временное увеличение экстинкции НАДФ-H_2 при 340 *ммк*.

Галактозо-1-фосфатуридилтрансфераза, полученная из тканей млекопитающих и бактерий, имеет оптимум активности при pH 8,7. Субстрат и индикаторный фермент находятся в избытке.

Индикаторный фермент не должен быть загрязненным дегидрогеназой 6-фосфоглюконовой кислоты. Это проверяют известным количеством глюкозо-1-фосфата и глюкозо-6-фосфата. На 1 *мкмоль* гексофосфата может образоваться только 1 *мкмоль* НАДФ-H_2. Рекомендуется прямая проверка на дегидрогеназу 6-фосфоглюконовой кислоты.

Реактивы: 1) глициновый буферный раствор (1 *М*; pH 8,7): 7,5 *г* глицина растворяют в 75 *мл* дистиллированной воды, pH доводят до 8,7 приблизительно 1,4 *мл* 5 н. раствора едкого натра, дополняют дистиллированной водой до 100 *мл*; 2) цистеин (приблизительно 0,2 *М* раствор): 350 *мг* гидрохлорида цистеина · H_2O растворяют в 9 *мл* дистиллированной воды. Непосредственно перед употреблением pH доводят до 8,5, добавляя приблизительно 0,7 *мл* 5 н. раствора едкого натра (контроль pH по индикаторной бумаге); 3) хлорид магния (0,1 *М* раствор): 2,03 *г* $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ растворяют в 100 *мл* дистиллированной воды; 4) галактозо-1-фосфат (Га-1-Ф), 0,01 *М* раствор: 34 *мг* калиевой соли галактозо-1-фосфата растворяют в 10 *мл* дистиллированной воды или 40 *мг* бариевой соли растворяют в 5 *мл* дистиллированной воды, переводят добавлением приблизительно 0,4 *мл* 10%-ного раствора сульфата натрия в натриевую соль; когда осадок больше не образуется, центрифугируют, осадок промывают дистиллированной водой и эту воду добавляют к надосадочной жидкости, раствор дополняют дистиллированной

[1] Га-1-Ф—галактозо-1-фосфат, УДФГ—уридиндифосфат-глюкоза, Г-1-Ф —глюкозо-1-1-фосфат, УДФГа —уридиндифосфат-галактоза.

водой до 10 *мл*; 5) глюкозоуридиндифосфат (0,01 *М* раствор; pH 8,7): 6 *мг* натриевой соли глюкозоуридиндифосфата растворяют в 1 *мл* дистиллированной воды; 6) никотинамидадениндинуклеотидфосфат (0,025 *М* β-никотинамидадениндинуклеотидфосфат): 20 *мг* натриевой соли НАДФ растворяют в 1 *мл* дистиллированной воды; 7) фосфоглюкомутаза (1 *ед/мл*)[1]: продукт, приготовленный из мышцы кролика[2], или готовый препарат соответственно разводят 2,5 *М* раствором сульфата аммония; 8) дегидрогеназа глюкозо-6-фосфата, ДГ-Г-6-Ф (приблизительно 1 *ед/мл*): продукт, приготовленный из дрожжей[3], соответственно разводят 3,3 *М* раствором сульфата аммония.

Галактозо-1-фосфат, буфер и раствор хлорида магния, а также суспензии фосфоглюкомутазы и дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата устойчивы в течение месяца при 0—4°; растворы глюкозоуридиндифосфата, НАД и цистеина готовят еженедельно и хранят на холоду в замороженном состоянии.

Техника. *Исследуемый материал*. Гемолизат эритроцитов или растворимая фракция печени крысы (надосадочная жидкость гомогената после центрифугирования приблизительно при 100 000 *g*)[4].

Постановка опыта. Экстинкцию измеряют при 340 *ммк* в кварцевых кюветах (толщина слоя 1 *см*, объем кюветы 1 *мл*, измеряемый объем 0,62 *мл*) при 25° против воды.

В опытную и сравнительную кюветы отмеряют пипеткой: 0,03 *мл* раствора цистеина (2); 0,01 *мл* раствора хлорида магния (3); 0,06 *мл* глицинового буферного раствора (1); 0,01 *мл* раствора НАДФ (6); 0,02 *мл* раствора глюкозоуридиндифосфата (5); 0,01 *мл* суспензии фосфоглюкомутазы (7); 0,01 *мл* суспензии дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата (8); пробу в количестве, соответствующем 50—10 *мкг* трансферазы; дистиллированную воду до 0,59 *мл*. Перемешивают, экстинкцию измеряют до постоянного значения (обычно 2 мин.), затем добавляют в сравнительную кювету 0,03 *мл* дистиллированной воды, а в опытную 0,03 *мл* раствора галактозо-1-фосфата (4). Приблизительно в течение 3 мин. экстинкцию отсчитывают каждые 30 сек. Начальная скорость образования НАДФ-H_2 служит критерием для активности галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы, которая содержится в пробе.

Вычисление. Объем смеси в опытной кювете составляет 0,62 *мл*, ∇E = 10 соответствует образованию 1 *мкмоля* НАДФ-H_2. Единица активности галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы — это количество фермента, которое при описанных здесь условиях восстанавливает 1 *мкмоль* НАДФ в минуту.

---

[1] Единица — количество фермента, которое при описанных здесь условиях способствует образованию 1 *мкмоля* НАДФ-H_2 в минуту.
[2] Приготовление см. V. Najar. В кн. Colowick S. a. Kaplan N. Methods in Enzymology, Acad. Press, N. Y., 1955, 1, 294.
[3] Приготовление см. там же, 1955, 1, 323.
[4] Приготовление см. Определение глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, стр. 593.

Следовательно:

$$\frac{\Delta E}{10} = \text{единицам/опытной смеси.}$$

Пример: анализируют 0,1 *мл* надосадочной жидкости гомогената печени крысы после центрифугирования (приблизительно при 100 000 *g*).

	Время, мин.	Сравнительная кювета	Опытная кювета
Перед добавлением галактозо-1-фосфата	0	0,208	0,210
	0,5	0,230	0,230
	1,0	0,235	0,235
	1,5	0,240	0,240
	2,0	0,240	0,240
После добавления		H_2O	Галактозо-1-фосфата
	3,0	0,238	0,352
	3,5	0,240	0,412 $\Delta E = 0,118$/мин.
	4,0	0,242	0,470
	4,5	0,245	0,528
	5,0	0,245	0,585 $\Delta E = 0,115$/мин.
	5,5	0,245	0,640
	6,0	0,245	0,698 $\Delta E = 0,113$/мин.
Среднее	$\Delta E = 0,007$/3 мин. $\Delta E = 0,002$/мин.		$\Delta E = 0,346$/3 мин. $\Delta E = 0,115$/мин.

0,115—0,002=0,113

Итак, активность галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы в опытной смеси составляет:

$$\frac{0,113}{10} = 0,0113 \text{ единиц, или } 0,113 \text{ } ед/мл \text{ надосадочной жидкости.}$$

Фермент при —10° сравнительно стабилен. Лиофилизируют и хранят в вакууме. В этих условиях сохраняется без потери активности больше месяца. Глутатион повышает активность.

При соблюдении всех условий опыта точность метода может быть доведена до 3—5%.

Метод можно использовать и для анализа растительного материала, а также в микроорганизмах.

Определение фумаразы [4]

(фумарат-гидратаза; КФ 4.2.1.2)

П р и н ц и п. Метод основан на определении активности фермента посредством флуорометрического измерения количества образующейся яблочной кислоты.

Реактивы. Субстрат состоит из 0,02 *M* фумаровой кислоты в 0,04 *M* растворе Na_2HPO_4 (pH 6,8 ± 0,1). Во избежание разложения бактериями его хранят в замороженном виде. Реакцию с этим субстратом проводят точно так же, как это описано для щелочной фосфатазы (см. стр. 500), причем при работе с 5—25 *мкг* мозга достаточна 30-минутная инкубация. Флуоресцентный реактив представляет собой свежеприготовленную смесь 1 объема раствора β-нафтола концентрации 56 *мг%* в 0,004 н. растворе едкого натра с 25 объемами 7 : 1 серной кислоты (875 *мл* концентрированной серной кислоты и 125 *мл* воды). В замороженом состоянии основной раствор β-нафтола можно хранить весьма долго; его выбрасывают, когда он приобретает отчетливую желтую окраску. Вязкий конечный реактив удобно брать пипеткой со шприцем; пользование стальной иглой не рекомендуется.

Техника. Если не производят определения белка, то осаждение кислотой можно опустить. Вместо этого пробирки после инкубации как можно скорее снова помещают в ледяную воду и в флуорометрическую пробирку емкостью 3 *мл* (специальная пробирка из стекла пирекс), добавляют 8 *мкл* аликвотной части пробы, смешивая ее с реактивом для флуоресценции. Для прекращения действия фермента содержимое пробирки немедленно перемешивают.

Из-за значительной вязкости рекомендуется энергичное размешивание мешалкой, после чего каждую пробирку закупоривают корковой пробкой, покрытой алюминиевой фольгой, и в течение 30 мин. нагревают на кипящей водяной бане. После охлаждения до комнатной температуры пробки вынимают, снова перемешивают пробы и производят отсчет на флуорофотометре с первичным светофильтром и корнинг-стекла № 5860 (фильтр В-1 выделяет ртутную линию 365 *ммк*) и вторичным фильтром из корнинг-стекла № 5543 и 3387 (максимум пропускания при 465 *ммк*).

Отсчеты производят относительно раствора хинина в 0,1 н. растворе серной кислоты или, ввиду сравнительной устойчивости флуоресценции к свету, относительно одной из стандартных проб. Последние удобно готовить, заменяя обычный субстрат (10 *мкл*) 0,5; 1, 2 и 5 *ммолями* раствора яблочной кислоты в субстрате. Стандартные пробы подвергаются той же обработке, что и образцы и холостые пробы. После 30-минутной инкубации 1 *ммоль* стандарта окажется эквивалентным $20 \cdot 10^{-9}$ *молям* образующейся в течение часа яблочной кислоты.

Определение белка производят в трихлоруксусном осадке (2 *мкл* 66%-ного раствора трихлоруксусной кислоты добавляют после инкубации), определение малата производят в 10 *мкл* верхней жидкости. Промывать осадок нет необходимости.

Замечания к методу определения фумаразы. Вплоть до 10^{-5} *M* наблюдается линейная зависимость между флуоресценцией и конечной концентрацией. При более высоких концентрациях расчет производят по стандартной кривой. Отстаивание образцов в течение 1 часа и дольше, до нагревания, не влияет на конечные

показания. Спустя 3 часа после нагревания изменения флуоресценции установить не удалось. При нагревании образцов при 100° в течение 30, 45 и 60 мин. были получены одни и те же данные. Большое влияние оказывает концентрация серной кислоты: применение концентрированной кислоты и кислоты в разведении 6 : 1 давало интенсивность флуоресценции соответственно 86 и 43% по сравнению с интенсивностью при употреблении серной кислоты в разведении 7 : 1. При более низкой температуре (60°) реакция протекает очень медленно, и, видимо, не до конца.

Реактив утрачивает свою активность после 30 мин. нагревания до 100°. Колебание в предписанных (оптимальных) концентрациях β-нафтола не должно превышать 20%.

Флуоресценция реактива (в основном за счет β-нафтола) ощутима и эквивалентна приблизительно $2 \cdot 10^{-9}$ *молям* на 1 *мл* (что эквивалентно активности приблизительно 1 *мкг* мозга в час). Поскольку холостая проба и малат обладают разными спектрами флуоресценции, влияние холостой флуоресценции сводится к минимуму вторичными флуорометрическими фильтрами. В случае надобности влияние холостой пробы можно уменьшить, проявляя флуоресценцию в меньшем объеме пробы и разбавляя ее перед отсчетом серной кислотой (7 : 1). Применение в качестве разбавителя более разбавленной кислоты дает низкие значения.

Реакция малата очень специфична. Флуоресценция, вызываемая нижеследующими веществами, составляет менее 1% флуоресценции эквимолярного количества малата: ацетат, малонат, сукцинат, фумарат, цис-аконитат, α-кетоглутарат, глицин, аланин, аденин, урацил и ксилоза. Флуоресценция следующих веществ составляет 1—3% флуоресценции эквимолекулярного количества малата: глюкоза, фруктоза, лактат, цитрат, пируват, оксалацетат, аспарагинат и глютамат. Точность метода 5%.

Определение изокарбоангидразы [5]

(карбоангидраза: КФ 4.2.1.1)

Принцип. Измеряя время, необходимое для гидратации определенного количества двуокиси углерода в присутствии индикатора — фенолового красного, определяют содержание фермента в относительных единицах. Производя то же измерение после добавления ацетотазоламида, определяют активность карбоангидразы тканевого происхождения (изокарбоангидразы), в отношении которой ацетазоламид проявляет ингибирующее действие.

Реактивы: 1) вероналовый буферный раствор (1 н., pH 7,9): растворяют 8,1 *г* диэтилбарбитуровой кислоты в дистиллированной воде, добавляют 22 *мл* 1 н. раствора едкого натра и доводят дистиллированной водой до 1000 *мл*; 2) щелочной раствор индикатора: растворяют 100 *мг* фенолового красного, добавляют 5,7 *мл* 0,05 н. раствора едкого натра и доливают дистиллированной водой до 100 *мл*; 3) вода, насыщенная двуокисью углерода при 0°;

4) 1 н. раствор соляной кислоты, охлажденный до 3°; 5) раствор ацетазоламида, насыщенный при комнатной температуре (приблизительно 0,003 *М*); 6) стандартный фосфатный буферный раствор и прочие реактивы, необходимые для электрометрического титрования оснований со стеклянным электродом.

Техника. В склянки объемом 20 *мл* наливают по 3 *мл* вероналового буферного раствора, 0,5 *мл* дистиллированной воды, 0,5 *мл* сыворотки и 0,1 *мл* щелочного раствора индикатора. Смесь охлаждают в ледяной бане до 3° и в каждую склянку добавляют по 0,5 *мл* воды, насыщенной двуокисью углерода. Во второй серии склянок 1 *мл* воды заменяют 1 *мл* насыщенного раствора ацетазоламида. В контрольной серии вместо воды, насыщенной двуокисью углерода, наливают обычную дистиллированную воду. Измеряют время от начала реакции до конечной точки — pH 6,4. Густую желтую окраску, приобретаемую раствором при указанном pH, сравнивают с окраской стандарта, приготовляемого предварительно, посредством электрометрического титрования раствора против стандартного фосфатного буфера. В пробе, не содержащей CO_2, определяют количество свободных оснований посредством титрования 0,1 н. раствором соляной кислоты до той же конечной точки.

Исследуемый материал. Кровь берут из вены сухой иглой и, отбросив первые капли, 3—4 *мл* наливают в сухие пробирки. Сыворотку, отделившуюся после свертывания проб крови, переносят в сухие пробирки и центрифугируют, для анализа берут надосадочную жидкость. Взятие крови должно производиться одним и тем же лицом в строго одинаковых условиях.

Расчет. Активность гидратации углекислого газа выражают в *мкмолях* CO_2, гидратированного в присутствии 1 *мл* сыворотки в течение 1 сек: v = *мкэкв* титруемых оснований $\times 10^3/15 \times$ время реакции в сек. Применяются следующие обозначения для скорости указанной реакции: $v_{испр}$ — средняя тотальная гидратационная активность; $v_{ингиб}$ — гидратационная активность, не зависящая от карбоангидразы эритроцитов; $v_{карб}$ — активность карбоангидразы, рассчитывается как разность между двумя предыдущими величинами:

$$v_{карб} = v_{испр} - v_{ингиб}.$$

Источники ошибок. Одновременно с определением активности гидратации CO_2 следует определять содержание гемоглобина в сыворотке крови. Если в сыворотке количество гемоглобина высокое (что объясняется как физиологической деструкцией эритроцитов, так и гемолизом, связанным с манипулированием с кровью), определение следует повторить, тщательно соблюдая все предосторожности, во избежание гемолиза.

Специфичность. В большинстве случаев при нефропатиях уровень карбоангидразы в крови повышен, однако строгой специфичности указанной реакции, в зависимости от характера патологии, установить не удается.

Электрофоретический метод определения карбоангидразы крови дает несколько бо́льшую информацию относительно присутствия в сыворотке крови карбоангидразы тканевого происхождения, однако этим методом можно получить лишь качественный результат.

Данных о проверке метода другими лабораториями пока не имеется.

Определение гиалуронидазы [6]

(гиалуронат-лиаза: КФ 4.2.99.1)

Принцип. Турбидиметрический метод может быть использован для определения гиалуронидазы двумя путями. Первый состоит в определении степени гидролиза гиалуроновой кислоты и аналогичен методу определения понижения вязкости. Его недостатком является большая продолжительность, так как с каждым образцом необходимо производить различные операции. Более простой метод состоит в определении количества гиалуроновой кислоты, остающейся спустя некоторое определенное время после ее гидролиза. В этом случае для каждого препарата требуется только одно определение мутности. Описываемый ниже метод основан именно на этом.

Реактивы: 1) гиалуроновая кислота: пуповину человека отмывают от крови и хранят на льду под ацетоном. Приготовляют «ацетоновый» порошок размалыванием в мясорубке и промыванием ацетоном. В течение двух часов энергично размешивают 200 *г* сухого порошка, 1200 *мл* раствора Хаэма и 300 *мл* воды. Полученный раствор центрифугируют, после чего фильтруют через стеклянную вату. Гиалуроновую кислоту осаждают, вливая раствор в 12 *л* холодного ацетона. Вязкий материал промывают трижды холодным ацетоном, фильтруют, промывают на фильтре два раза спиртом и безводным эфиром, под конец ставят на 24 часа в эксикатор над P_2O_5. Подобная обработка дает выход 6% продукта с относительной вязкостью 3,0 при концентрации 10 *мг/мл*.

Для турбидиметрического определения концентрацию (при помощи раствора фосфатного буфера с pH 5,5) доводят до 3,0 *мг/мл*. Полученный таким образом раствор слегка опалесцирует, но он может быть совершенно прозрачным посредством фильтрования через фильтр Зейтца. Для получения стандартной мути его разбавляют тем же буфером. Обычно требуется разбавление примерно 2 : 3; 2) подкисленный альбумин лошадиной сыворотки: в 1000 *мл* 0,1 *М* раствора ацетатного буфера с pH 4,1 растворяют 1 *г* кристаллического альбумина лошадиной сыворотки, после чего pH доводят до 3,75 при помощи 4 н. раствора соляной кислоты. Этот раствор можно хранить неопределенно долгое время при 4°; 3) раствор фермента: гиалуронидазу готовят по методу Гана из яичек быка, используя материал, полученный после первого осаждения сульфатом аммония. Приготовленный таким образом фермент освобождают от сульфата диализом при 4° и хранят в воздушно-сухом состоянии

на холоду. Перед анализом растворяют в 0,2 *М* растворе боратного буфера (рН 7,5). Активность такого препарата составляет примерно 250 понижающих вязкость единиц на 1 *мг* азота.

Активность фермента устанавливают при 38°. Активность различных препаратов гиалуроновой кислоты бывает разной. Это препятствие устраняют внесением поправки во все активности, исходя из таковой, полученной в результате анализа, проведенного с определенным количеством гиалуроновой кислоты. Величину единицы активности находят по определенному количеству стандартного препарата фермента, из которого исходят для выведения калибровочной кривой. На холоду (—20°) сухой препарат фермента хорошо сохраняется в течение года.

Техника. 1 *мл* раствора смешивают с 1 *мл* раствора гиалуроновой кислоты (навеску фермента растворяют в 0,5 *мл* 0,2 н. боратного буферного раствора, рН 7,5) и смешивают с 0,5 *мл* 0,9%-ного раствора поваренной соли. Поваренную соль вводят для удобства определения ингибиторов гиалуронидазы. Эту смесь инкубируют на протяжении 45 мин. при 38° в кювете фотоэлектрического колориметра. К концу этого промежутка времени добавляют 100 *мл* подкисленного альбуминового реактива (2) комнатной температуры и тщательно встряхивают смесь для получения полного смешивания. Ровно через 5 мин. (по секундомеру) производят отсчет в фотоэлектрическом колориметре с фильтром на 600 *ммк*.

Некоторый недостаток турбидиметрического метода заключается в трудности устранения колебаний характера измеряемой мути. Кроме того, линейное отношение между концентрацией субстрата и оптической плотностью соблюдается в сравнительно узких пределах. Менее капризны колориметрические методы, например метод с использованием бромсульфофталеина (двунатриевого фенол-тетрабромфталеина), предложенный для этой цели. Активность гиалуронидазы можно также определять по скорости ферментативной реакции, измеряемой спектрофотометрически на длине волны 580 *ммк*. Точность метода около 10%. Другие методы определения см. [10], стр. 46.

Определение антигиалуронидазы [7]

Принцип. В основу изучаемой реакции положено количественное определение антифермента, предположительно содержащегося в сыворотке и нейтрализующего фермент гиалуронидазу. Индикатором реакции служит гиалуроновая кислота, которая в кислой среде образует видимый сгусток муцина.

При наличии в сыворотке антигиалуронидазы гиалуроновая кислота не расщепляется гиалуронидазой, что подтверждается выпадением муцинового сгустка.

Реактивы: 1) гиалуроновая кислота или 0,15%-ный гиалуронат калия в дистиллированной воде: собирают пупочные канатики, очищенные от крови, и сейчас же заливают их ацетоном, сохраняют при температуре около 4° (в холодильнике) до сбора необходимого

количества (в лабораториях с большим объемом работы обыкновенно обрабатывают сразу до 20—30 штук). Канатики разрезают продольно ножницами и тщательно промывают под сильной струей проточной воды; затем пропускают через мясорубку. К 500 *г* размолотой массы прибавляют 1 *л* дистиллированной воды и сохраняют в холодильнике в течение 24 час. Затем фильтруют через несколько слоев марли. Фильтрат сохраняется, а остальная масса заливается повторно 1 *л* дистиллированной воды. При некоторых методиках используется водный экстракт, содержащий гиалуроновую кислоту.

Более удобен очищенный кристаллический экстракт, для получения которого описанная выше обработка продолжается. Двойное количество экстракта собирают вместе и центрифугируют для удаления кусочков ткани; получают опалесцирующую жидкость, pH которой доводится до 9,5 при помощи 1 н. раствора едкого калия (допустимы отклонения в pH между 9,0 и 10,0). После этого к жидкости добавляют 1,25 объема метилового спирта (насыщенного ацетатом калия). Смешивание проводят медленно и внимательно при постоянном встряхивании. При такой обработке гиалуроновая кислота выпадает в виде асбестоподобных кристаллов гиалуроната калия. Жидкость пропускают через очень густое сито, на поверхности которого задерживаются кристаллы, которые затем тщательно промывают холодным метиловым спиртом и в конце эфиром. После испарения эфира их очищают еще раз. Для этой цели кристаллы гиалуроновой кислоты растворяют в дистиллированной воде и оставляют на 24 часа в холодильнике, временами встряхивая. Нерастворенные частицы устраняют центрифугированием; после повторного подщелачивания гиалуроновая кислота осаждается тем же способом, т. е. метиловым спиртом. После промывания эфиром кристаллы высушивают лучше всего в вакууме над фосфорным ангидридом (P_2O_5).

Высушенные кристаллы растирают в очень мелкий порошок и сохраняют при комнатной температуре в эксикаторе. Существует и готовый, фабричным путем приготовленный перепарат — гиалуронат калия; 2) гиалуронидаза. Как правило, стрептококковая гиалуронидаза может быть получена из каждого штамма стрептококка, который вырабатывает в бульонной культуре этот продукт жизнедеятельности бактерий (бульон подобен тому, который используется для получения стрептолизина) [7].

В Копенгагенском институте для этой цели служит штамм S-44 (H44), который засевают в трипсиновый бульон.

Приготовление трипсинового бульона. Лошадиное мясо очищают от жира и пропускают через мясорубку. 1,8 *кг* фарша смешивают с 2 *л* воды, нагревают до 80° при частом размешивании. При достижении указанной температуры добавляют еще 4 *л* холодной воды. pH доводится до 8,0 добавлением безводного углекислого натрия (обыкновенно расходуется около 150 *г* углекислого натрия). Бульон, который приготовлен для посева, подогревают приблизительно

до 50° и к нему добавляют отдельными порциями (до 6—8) с получасовым интервалом трипсиновую эмульсию. (Для приготовления трипсиновой эмульсии берут 80 г очищенной и смолотой свиной поджелудочной железы и смешивают со 100 *мл* 96%-ного этанола и с 240 *мл* дистиллированной воды. После 3-дневной экстракции при комнатной температуре прибавляют соляную кислоту в таком количестве, чтобы содержание ее в эмульсии равнялось 0,1%, и до употребления сохраняют в холодильнике.) Для трипсинового переваривания необходима температура около 50° и pH около 8,0 (при сдвиге реакции в сторону закисления подщелачивают карбонатом натрия.) После 3—4 часов стояния, во время которого смесь необходимо часто размешивать и встряхивать, прибавляют 60 *мл* ледяной уксусной кислоты и кипятят в течение 30 мин. Непереварившиеся частицы отфильтровывают, и жидкость оставляют на ночь в холодильнике. На следующий день опять кипятят 30 мин. и доводят pH до 7,0 (5 н. раствором едкого натрия). Затем берут 9,3 *г* дрожжей, которые размешивают сначала в небольшом количестве бульона, а затем в общем количестве.

В течение 1 часа поддерживается температура около 30° при pH около 8,0 (исправляют 5 н. раствором едкого натрия). Затем бульон подогревают до 100°, добавляют в него 0,3% мальтозы и пропускают сначала через бумажный фильтр, а затем через фильтр Зейтца. Приготовленный таким образом бульон разливают стерильно небольшими количествами. 1 *л* трипсинового бульона засевают 8-часовой предварительной культурой стрептококка Н-44 (или другого подходящего штамма) и ставят в термостат при 37° на 36—48 час., после чего бульонную культуру центрифугируют для осаждения бактериальных тел. Надосадочную жидкость пропускают через фильтр Зейтца и быстро разливают в маленькие бутылочки (по 30—40 *мл*). Затем жидкость замораживают при минус 20° для длительного хранения; 3) субстратная смесь: состоит из 1 части 0,15%-ного раствора гиалуроновой кислоты, растворенной в дистиллированной воде, 1 части лошадиной сыворотки, разведенной десятикратно физиологическим раствором, и 2 частей дистиллированной воды; 4) 2 н. раствор уксусной кислоты.

Т е х н и к а. 0,5 *мл* стрептококкового бульона, содержащего гиалуронидазу, разбавляют дистиллированной водой с коэффициентом, равным 2, начиная от 1 : 4 до 1 : 2048. В каждую пробу прибавляют по 0,5 *мл* дистиллированной воды. Пробирки охлаждают в ледяной воде в течение 1 мин. Затем в каждую пробирку прибавляют по 1 *мл* субстратной смеси и помещают их в водяную баню при 37° на 20 мин., после чего вносят во все пробирки по 0,2 *мл* 2 н. раствора уксусной кислоты. Пробирки встряхивают и внимательно наблюдают за появлением сгустка, который образуется при наличии нерасщепленной гиалуроновой кислоты (или гиалуроната калия) в кислой среде. Если бульон обладает гиалуронидазной активностью, то в определенном количестве пробирок он будет предупреждать появление муцинового сгустка. Лишь когда гиалуронидаза отсутствует, появ-

ляется сгусток, который остается до конечного разведения. Схема анализа приведена в табл. 1.

При определении гиалуронидазной активности в указанном примере сгусток образуется при ее разведении до 1 : 1024, т. е. в данном разведении ее действие истощается. Следовательно, разведение 1 : 512 последнее, где действие гиалуронидазы еще проявляется. Это разведение принимается за единицу, общее количество единиц вычисляется обратным геометрической прогрессии путем: например, неразведенная гиалуронидаза (т. е. бульонная культура стрептококка) содержит 512 единиц, разведение 1 : 4—128 единиц и т. д. Для рабочей дозы используется гиалуронидаза, содержащая 16 единиц. В данном случае бульон надо развести в 32 раза.

Техника определения антигиалуронидазной активности сывороток. Испытуемые сыворотки для устранения неспецифических ингибиторов предварительно инактивируют при 50° в течение 30 мин., затем разбавляют дистиллированной водой по схеме, приведенной в табл. 2. Дальнейшие манипуляции проводят по схеме, приведенной в той же таблице. Как видно из таблицы, при разведении сыворотки 1 : 2048 еще имеется сгусток, содержащий антигиалуронидазные антитела, которые не дают возможности гиалуронидазе расщепить гиалуроновую кислоту.

В следующем разведении 1 : 4096 фермент гиалуронидаза проявляет свою активность и сгусток отсутствует. Принято антигиалуро-

Таблица 1

Жидкость, *мл*	№ пробирок									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Разведение									
	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
Бульон 1 : 2	0,5	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Дистиллированная вода	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
В каждую пробирку последовательно переносят по 0,5 *мл*										
Дополнительно дистиллированная вода . .	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Ледяная вода в течение одной минуты										
Субстратная смесь . .	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Водяная баня при 37° в течение 20 мин.										
Уксусная кислота . . .	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Наличие сгустка . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
Количество гиалуронидазных единиц	128	64	32	16	8	4	2	1	—	—

Таблица 2

Жидкость, мл	№ пробирок									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Разведение									
	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16 384
Сыворотка, разведенная дистиллированной водой 1 : 16	0,5	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Дистиллированная вода	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
В каждую пробирку последовательно переносят по 0,5 *мл*										
Гиалуронидазный бульон, разведенный 1 : 32	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Ледяная вода в течение 5 мин.										
Субстратная смесь . . .	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	—
Водяная баня при 37° в течение 20 мин.										
Ледяная вода в течение 5 мин.										
Уксусная кислота . . .	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Результат реакции . . .	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—

нидазные единицы выражать реципрокно в отношении разведения, в данном случае 2048 антигиалуронидазных единиц. При указанной методике нормальные показатели выражаются цифрой 256. Точность метода 10—15%.

Определение креатинфосфокиназы [8]

(креатинкиназа: КФ 2.7.3.2)

Принцип. При добавлении сыворотки крови к инкубационной смеси, содержащей креатинфосфат и АДФ, образуется креатин. Последний определяют при помощи цветной реакции с α-нафтолом и диацетилом. Об активности фермента креатинфосфокиназы (КФК) судят по количеству образовавшегося креатина.

Реактивы (все реактивы готовятся на дистиллированной воде): 1) 0,1 *М* раствор трис-буфера (гидрооксиметиламинометан), pH 7,2; 2) 0,006 *М* раствор креатинфосфата; 3) 0,06%-ный раствор АДФ; 4) 5%-ный раствор $Ba(OH)_2$; 5) 5%-ный раствор $ZnSO_4$; 6) 1%-ный раствор α-нафтола (100 *мг* α-нафтола растворяют в 10 *мл* щелочного раствора, содержащего 16% Na_2CO_3 и 6% NaOH); 7) 0,4%-ный раствор диацетила.

Техника. В пробирку отмеряют 0,25 *мл* трис-буферного раствора в дистиллированной воде, 0,1 *мл* раствора креатинфосфата и

добавляют 0,1 *мл* сыворотки крови. В контрольную пробу вместо сыворотки добавляют воду. Пробы ставят в водяную баню при 37° на 3 мин., затем добавляют по 0,2 *мл* раствора АДФ и инкубируют 30 мин., после чего реакцию останавливают добавлением 0,2 *мл* 5%-ного раствора $Ba(OH)_2$ и 0,2 *мл* 5%-ного раствора $ZnSO_4$ (осаждение белков). Через 15—20 мин. пробы центрифугируют. К 1 *мл* надосадочной жидкости добавляют 1 *мл* свежеприготовленного 1%-ного раствора α-нафтола и 0,5 *мл* свежеприготовленного 0,4%-ного раствора диацетила.

При этом строго соблюдается последовательность добавления реактивов.

Пробирки помещают в темноту на 20 мин. для развития окраски, после чего колориметрируют при помощи электрофотоколориметра ФЭК-М или ФЭК Н-57. Кювета шириной 5 *мм*. Светофильтр с максимумом пропускания в 536 *ммк*.

Активность фермента пропорциональна разности экстинкций между опытным и контрольным определениями.

Расчет производится при помощи стандартной кривой, построенной по креатину. За единицу активности КФК принимают ферментную активность 0,1 *мл* сыворотки, которая образует при указанных выше условиях (инкубация при 37° в течение 30 мин.) 1 *мкг* креатина. В норме активность креатинфосфокиназы в сыворотке крови колеблется от 0,2 до 4 ед. Точность метода 5—10%.

Однако более чувствителен спектрофотометрический метод, основанный на оптическом тесте Варбурга. Переход кофермента (НАД) из окисленной формы в восстановленную сопровождается изменением спектра поглощения в ультрафиолетовой зоне спектра. В окисленной форме кофермент дает одну узкую полосу поглощения при 260 *ммк*. В восстановленной форме ($НАД-Н_2$) поглощение света в этой зоне резко понижается и появляется вторая широкая полоса при 340 *ммк*. Вторая полоса обусловлена исчезновением одной двойной связи в никотинамидном компоненте кофермента [1].

Определение креатинкиназы [9]

(КФ 2.7.3.2)

П р и н ц и п. Активность креатинкиназы определяют по количеству креатина, освобождающегося в результате реакции:

$$\text{АДФ} + \text{креатинфосфат} \rightarrow \text{АТФ} + \text{креатин}.$$

Количественное определение креатина производят, измеряя оптическую плотность окраски, образующейся при взаимодействии креатина с диацетилом и α-нафтолом. Сульфгидрильные соединения, мешающие этой реакции, устраняют, связывая их *п*-хлормеркурибензоатом и увеличивая время реакции до 60 мин.

Р е а к т и в ы: 1) буферный раствор: растворяют 13,6 *г* имидазо-

[1] M. T a n z e r a. C. G i l v a r. J. Biol. Chem., 1959, 234, 3201.

ла и 4,3 *г* щавелевокислого магния (тетрагидрата) в 800 *мл* воды. Реакцию раствора доводят до pH 6,8 при 25° добавлением необходимого количества ледяной уксусной кислоты, разбавляют до 1 *л*, перемешивают и хранят при комнатной температуре; 2) субстрат: 95 *мл* натриевой соли фосфокреатина растворяют в 2,5 *мл* буферного раствора и добавляют 7,5 *мл* воды. По 0,2 *мл* готового раствора разливают в пробирки размером 16 × 100 *мм* и хранят в холодильнике; 3) АДФ: 0,266 *г* натриевой соли АДФ растворяют в 25 *мл* буферного раствора (1) и доливают водой до 50 *мл*. Сохраняют в холодильнике, разлив по пробиркам по 1—2 *мл*; 4) едкое кали, 40%-ный раствор; 5) гидроокись бария 0,3 н. раствор; 6) сульфат цинка, 5%-ный раствор по весу; 7) нингидриновый реактив: готовят 1%-ный раствор нингидрина в 95%-ном этаноле, хранят при комнатной температуре; 8) стандартный раствор креатина: растворяют 0,1492 *г* гидрата креатина в воде и доводят объем до 500 *мл*, хранят в холодильнике; 9) раствор меркаптоэтанола: 0,1 *мл* 2-меркаптоэтанола разбавляют буфером до 50 *мл*. Раствор готовят непосредственно перед употреблением.

Стойкость реактивов. Содержание креатина в растворе, определяемое флуорометрически, понижается в течение каждой недели примерно на 1%. Исходный и перекристаллизованный креатин дает одинаковые показатели флуоресценции.

Техника. В три пробирки, обозначенные «КР», «СТ» и «Х» (контроль на реактивы, стандарт и исследуемый материал), с предварительно налитыми в них по 0,2 *мл* субстрата, вносят 0,2 *мл* раствора меркаптоэтанола; в пробирки, обозначенные «КР», «СТ» и «Х», вносят соответственно 0,1 *мл* воды, 0,1 *мл* стандартного раствора и 0,1 *мл* исследуемой сыворотки. Содержимое пробирок перемешивают и нагревают в водяной бане до 25° в течение не менее 5 мин. Во все пробирки с интервалами по 30 сек. добавляют по 0,2 *мл* раствора АДФ и инкубируют в течение 10 мин. (точно). По прошествии этого времени реакцию останавливают, добавляя во все пробирки по 2 *мл* 0,3 н. раствора гидроокиси бария и по 5 *мл* воды. Затем в каждую пробирку добавляют по 2 *мл* 5%-ного раствора сульфата цинка, пробирки энергично встряхивают сразу после добавления реактива и оставляют стоять в течение 10 мин., вновь встряхивают и центрифугируют в течение 5 мин. По 4 *мл* надосадочной жидкости, взятые из каждой пробирки, переносят в пробирки размером 16 × 100 *мм* и добавляют в них по 1,5 *мл* 95%-ного этанола и 2 *мл* 1%-ного раствора нингидрина. Содержимое пробирок перемешивают, затем во все пробирки, начиная с «КР», добавляют по 0,5 *мл* 40%-ного раствора КОН и переносят их содержимое в флуометрические кюветы. В интервале времени между 5-й и 15-й минутами после добавления КОН измеряют флуоресценцию «Х» и «СТ», поставив на 0% «КР».

Вычисление:

$$\frac{\text{Показания флуорометра «Х», \%} \times 200}{\text{Показания флуорометра «СТ», \%}} = \text{ед}/10^{8}\ \textit{мкмолей}\ \text{креатина}/\textit{мл}/\textit{мин}.$$

Если активность креатинкиназы в пробе превышает 1200 ед., анализ следует повторить, разбавив исследуемый материал.

Источники ошибок. Флуоресценция раствора достигает максимума в течение 5 мин., начиная с момента добавления щелочи, после чего медленно понижается: поэтому следует добавлять едкое кали, точно соблюдая 30-секундные интервалы, и производить измерения флуоресценции, точно соблюдая время во всех случаях. Гемолиз не препятствует определению активности креатинкиназы.

Данных о проверке метода другими лабораториями пока не имеется.

Определение антистрептокиназы [10]

Принцип. В методике используется способность сыворотки при наличии соответствующих антител ингибировать фибринолитическую активность стрептокиназы в отношении ее действия на фибриновый сгусток.

Реактивы: 1) плазма крови человека как источник фибриногена: берут 8 *мл* крови в центрифужную пробирку с 0,5 *мл* 0,2%-ного раствора оксалата натрия. Кровь после тщательного перемешивания с антикоагулянтом центрифугируют, верхний слой (плазму) тщательно отсасывают в другую пробирку; 2) стрептококковый бульон (бульонная культура стрептококкового штамма, продуцирующего стрептокиназу [10]). Используют бульон, дающий оптимальное развитие стрептококков и наибольшую продукцию стрептокиназы. Могут быть употреблены различные штаммы, обладающие этой способностью. Рекомендуется добавлять в питательную среду, не содержащую фенола, лошадиную сыворотку (5% общего объема среды); 3) тромбин. Для приготовления тромбина к 1 *мл* плазмы прибавляют 9 *мл* дистиллированной воды (при температуре 0°, сосуд погружают в измельченный лед) с последующим пропусканием углекислоты в течение 10 мин. Уже спустя несколько минут появляется муть. Жидкость переносят в охлажденную центрифужную пробирку и центрифугируют приблизительно при 3000 *об/мин* в течение 10 мин. Надосадочную жидкость сливают, а остаток ее удаляют при помощи фильтровальной бумаги.

К полученному на дне белому осадку прибавляют 8 *мл* физиологического раствора (0,9%-ный раствор $NaCl$) и 2—3 капли 0,1 н. раствора едкого натра до получения pH между 6,9 и 7,1. Осадок при этом растворяется полностью. 1 *мл* этой жидкости смешивают с 0,1 *мл* стерильного 2,5%-ного раствора хлористого кальция и оставляют при комнатной температуре 30 мин. Образуется нежный сгусток, который осторожно удаляют платиновой петлей. Оставшаяся прозрачная жидкость содержит тромбин.

Вместо отдельно приготовленного тромбина можно употребить смесь, состоящую из 0,25 *мл* 2,5%-ного хлористого кальция и 0,2 *мл* плазмы, которая образует сгусток; 4) физиологический раствор; 5) 2,5%-ный раствор хлористого кальция; 6) 0,1 н. раствор едкого натрия.

Техника. Проводят предварительный опыт для определения стрептокиназной активности бульона. Для этого используют неразведенный бульон и разведенный физиологическим раствором до 1 : 10 и 1 : 100. Схема реакции указана в табл. 1. Пробирки помещают в водяную баню при 40° на 45 мин., после чего учитывают результат. В пробирках 1—9 может наступить фибринолиз, выраженный в различной степени. В контрольной пробирке, где содержится плазма, физиологический раствор и тромбин, лизиса не произойдет.

Главный опыт. За исключением количества стрептококкового бульона, все остальные ингредиенты реакции, указанные в схеме предварительного опыта, остаются те же. По результатам предварительного опыта, определяющего фибринолитическую силу стрептоккового бульона, ориентируются в необходимом для главного опыта количестве бульона, который вносят во все пробирки с сывороточными разведениями в одном и том же количестве. В главном опыте используется двойная литическая доза предварительного опыта. Например, в предварительном опыте установлено, что до пробирки 4 имеется фибринолиз. Это значит, что при концентрации неразведенного бульона в количестве 0,025 *мл* все еще имеется литическая активность. В пробирках 5—9 лизис не получен. В таком случае в главном опыте следует использовать 0,05 *мл*, но так как количество очень незначительное и точное измерение затруднено (непременно с микропипеткой), то можно употребить 0,5 *мл* из бульона, разведенного 1 : 10. Схема реакции приведена в табл. 2 (см. стр. 577).

После остановки опыта пробирки помещают в водяную баню при 45° на один час, затем учитывают наличие или отсутствие фибринолиза. Если в исследуемой сыворотке имеется антистрептокиназа, которая задерживает литический процесс, то в пробирке образовавшийся сгусток плазмы остается неизменным. В остальных пробирках, где антистрептокиназа отсутствует, свое действие проявляет стрептокиназа (стрептококковый бульон), наблюдается лизис, т. е. сгусток отсутствует.

Результат реакции учитывают по реципрокной системе. Например, при отсутствии лизиса до пробирки 6 включительно (т. е. разведение сыворотки 1 : 28), учитывается 128 единиц антистрептокиназы; для данной методики это верхняя граница нормы. Количество антистрептокиназных единиц более 128 указывает на повышенное содержание этих антител. Точность метода 10—15%.

Недостатки реакции: 1. Основным недостатком является использование различных штаммов стрептококков, продуцирующих разное количество стрептокиназы. 2. Отсутствие стандартизации при определении антистрептокиназных единиц. В этом отношении употребление готового лиофилизированного препарата стрептокиназы дает преимущество в смысле получения результатов, более близких к стандартным. 3. Иногда наблюдается необъяснимое лизирование во всех пробирках, несмотря на тщательную постановку опыта.

Таблица I

Схема предварительного опыта

Жидкость	№ пробирок									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Контроль
Плазма, *мл*	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Физиологический раствор, *мл*	0,7	0,8	0,4	0,7	0,8	0,8	0,2	0,4	0,7	0,8
Стрептококковый бульон, *мл*:										
неразведенный	0,25	0,1	—	—	—	—	—	—	—	
разведенный 1 : 10	—	—	0,5	0,25	0,15	0,1	—	-		-
разведенный 1 : 100	—	—		—	—	—	0,75	0,5	0,25	—
Соответствует неразведенному бульону, *мл*	0,25	0,1	0,05	0,025	0,015	0,01	0,0075	0,005	0,0025	
Тромбин, *мл*	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,01	0,1	0,1	0,1	0,1

Таблица 2

Схема главного опыта

Жидкость, *мл*	№ пробирок												Контроль
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
	Разведение												
	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	
Инактивированная сыворотка 1 : 2	0,5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,5 от 1 : 8
Физиологический раствор	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	В каждую пробирку последовательно переносят по 0,5 *мл*												
Плазма	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Стрептококковый бульон	Двойная литическая доза во все пробирки, кроме контрольной												
Тромбин	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Определение гуаназы [11]

(гуаниндезаминаза: КФ 3.5.4.3)

Принцип. Активность гуаназы определяют посредством измерения количества гуанина, превратившегося в ксантин в присутствии известного количества исследуемого материала. Поскольку тот же материал (кровь или сыворотка) содержит ксантин эндогенного происхождения, а также ксантиноксидазу, катализирующую превращение ксантина в мочевую кислоту, присутствие которой вызывает понижение светопропускания гуанина, исследуемый материал инкубируют с известными количествами гуанина и одновременно измеряют оптическую плотность контрольной пробы, содержащей, помимо всех ингредиентов опытной пробы, боратный буфер, ингибирующий действие ксантиноксидазы. Отношение разности оптических плотностей при 245 *ммк* стандартного раствора гуанина и реакционной смеси к разности оптических плотностей при 245 *ммк* того же раствора гуанина и стандартного раствора ксантина, за вычетом показаний соответствующих слепых проб, позволяет рассчитать активность гуаназы.

Реактивы: 1) исходный раствор гуанина: в мерной колбе емкостью 50 *мл* растворяют 50 *мг* гуанина в 10 *мл* 0,1 н. раствора едкого натра при осторожном нагревании и доводят дистиллированной водой до метки; раствор сохраняют в холодильнике, он стоек в течение 3 недель; 2) рабочий раствор гуанина: исходный раствор гуанина разбавляют 0,2 *М* раствором боратного буфера (5) рН 7,5 в отношении 1 : 2, готовят перед употреблением; 3) исходный раствор ксантина: в мерной колбе емкостью 50 *мл* растворяют 50,3 *мг* ксантина в 10 *мл* 0,1 н. раствора едкого натра и доводят водой до метки, сохраняют в холодильнике; раствор стоек в течение 3 недель; 4) рабочий раствор ксантина: перед употреблением исходный раствор ксантина разбавляют в отношении 1 : 20 0,2 *М* боратным буферным раствором, рН 7,5; 5) боратный буферный раствор: растворяют 2,5 *г* борной кислоты в 200 *мл* воды и реакцию раствора доводят до рН 7,5 40%-ным (по весу) раствором едкого натра; 6) фосфатный буферный раствор: растворяют 5,4 *г* двузамещенного фосфата натрия (кристаллогидрата) в 200 *мл* воды, реакцию раствора доводят до рН 6 концентрированной соляной кислотой.

Техника. На 5 эрленмейеровских колбах, объемом 25 *мл*, ставят следующие обозначения: *К* — контрольная проба, необходимая для установки нуля при измерении оптической плотности растворов гуанина и ксантина; *Г* — стандартный раствор гуанина; *Кс* — стандартный раствор ксантина; *К-Р* — контрольная проба, необходимая для установки нуля при определении оптической плотности реакционной смеси; *Р* — реакционная смесь. В колбах с соответствующими обозначениями составляют следующие смеси:

Раствор, *мкг*	*К*	*Г*	Колбы *Кс*	*К-Р*	*Р*
1. 0,2 *М* боратный буфер . . .	4	—	—	4	—
2. Дистиллированная вода . . .	1	1	1	0,8	0,8
3. Гуанин, 50 *мкг/мл*	—	4	—	—	4
4. Ксантин, 50 *мкг/мл*	—	—	4	—	—
5. Исследуемый материал . . .	—	—	—	0,2	0,2

Колбы, обозначенные *К-Р* и *Р*, инкубируют при 37° в течение 60 мин. и затем охлаждают под струей водопроводной воды в течение 15 сек. Во все 5 колб добавляют по 145 *мл* 0,1 *М* фосфатного буферного раствора pH 6 и, тщательно перемешав, определяют оптическую плотность опытных проб при 245 *ммк* против соответствующих контрольных проб.

Вычисление. Поскольку начальное количество гуанина в реакционной смеси составляет 1,32 *мкмолей*, активность гуаназы в *мкмолях* гуанина, превратившегося в ксантин в 1 *мл* исследуемого материала при 37°, может быть рассчитана по одной из следующих формул:

$$1{,}32 \times \frac{\text{оптич. пл. } Г - \text{оптич. пл. } Р}{\text{оптич. пл. } Г - \text{оптич. пл. } Кс} \times \frac{5}{60} \times 1000 = \text{миллиединиц активности}$$

или

$$\frac{\text{оптич. пл. } Г - \text{оптич. пл. } Р}{\text{оптич. пл. } Г - \text{оптич. пл. } Кс} \times 110 = \text{миллиединиц активности}$$

Пример. Если оптическая плотность *Г* равна 0,7, оптическая плотность *Кс* — 0,244 и оптическая плотность *Р* — 0,472, то активность гуаназы $= \frac{0{,}700-0{,}472}{0{,}700-0{,}244} \times 110 = 55$ миллиединиц.

Теми же авторами описан метод определения активности гуаназы, в котором для подавления действия ксантиноксидазы применяются анаэробные условия; помимо технических трудностей, этот метод не может быть применен в тех случаях, когда активность гуаназы превосходит 36 ед.

Данных о проверке метода другими лабораториями пока не имеется.

Определение фосфоглюкомутазы [12]

(глюкозофосфомутаза: КФ 2.7.5.1)

Принцип. Определение активности состоит в измерении уменьшения количества кислотолабильного фосфора, после инкубации фермента с глюкозо-1-фосфатом (Г-1-Ф) в качестве субстрата.

Реактивы: см. Техника.

Техника. Отмеряют в центрифужную пробирку 0,5 *мл* 0,025 *М* раствора дикалиевой соли Г-1-Ф, доведенной до pH 7,6, 0,1 *мл* буфера pH 7,4, 0,25 *мл* 0,2 *М* раствора гистидина, доведенного до pH 7,6, 0,1 *мл* 0,03 ммолярного раствора Mg^{2+} и 0,15 *мл* $2{,}5 \times 10^{-5}$ *М* раствора Г-1,6-Ф (глюкозо-1,6-фосфата). Пробирку ставят

в водяную баню с температурой 37° и через 5 мин. пускают в ход реакцию, прибавляя 0,5 *мл* сыворотки, предварительно подогретой до той же температуры. После 4 час. инкубации переносят 1 *мл* смеси в 5 *мл* охлажденного 5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Перемешивают и фильтруют в пробирки, охлажденные на льду. В отдельных частях фильтра определяют неорганический фосфор и кислотолабильный фосфор [12а], сравнивая с холостой пробой, освобожденной от белка в нулевое время.

Единица активности фермента равна 10^2 числа микромолей глюкозо-6-фосфата (Г-6-Ф), образующегося в 1 *мл* инкубационной смеси, в приведенных условиях. В норме активность фермента составляет в среднем 46 ± 17 единиц. Максимальная активность в этой группе равнялась 84 единицам, минимальная — 17.

Оптимум pH фермента равен 7,6. Активность не изменяется в пробе и в течение 8 час. при комнатной температуре. После двухдневного хранения в холодильнике при температуре 5—10° активность фермента заметно понижается. Точность метода 5%.

Определение фосфоглюкомутазы (ФГМ) по методу Нолтмана и Брунса [12а]

Принцип. В биологическом материале, постоянно содержащем избыток фосфогексоизомеразы, продукт реакции, катализируемой ФГМ, т. е. глюкозо-6-фосфат (Г-6-Ф), подвергается частичной изомеризации в фруктозо-6-фосфат (Ф-6-Ф). Следовательно, можно определить активность ФГМ, измеряя прирост Ф-6-Ф.

Техника. 1,0 *мл* коллидинового буферного раствора (0,1 *М*, pH 6,9—7,0), 0,25 *мл* сульфата магния (0,25 *М* раствор), 0,25 *мл* раствора цистеина (0,25 *М*, pH 7,0), 0,5 *мл* раствора глюкозо-1-фосфата (0,05 *М*) отмеряют в центрифужную пробирку и ставят в водяную баню при температуре 37°. Пускают в ход реакцию путем прибавления 0,5 *мл* сыворотки. Спустя 30 мин. инкубации реакцию прерывают, прибавляя 2,5 *мл* 10%-ного раствора хлорной кислоты, и центрифугируют. Для определения количества образовавшегося Ф-6-Ф отмеряют 1 *мл* центрифугата в пробирку, прибавляют 1,0 *мл* раствора резорцина (0,1% в абсолютном этаноле), а затем 3 *мл* 30%-ного раствора HCl. Перемешивают и подогревают 8 мин. при 80°, затем охлаждают. Через 30 мин. измеряют экстинкцию пробы при 490 *ммк* и толщине кюветы 1 *см*. Сравнение производят с холостой пробой, к которой хлорную кислоту приливают перед добавлением субстрата.

За меру активности принимают число микромолей гексозо-6-фосфата, образующегося из Г-1-Ф под влиянием 1 *мл* сыворотки в продолжение часа. Это число равняется полученному количеству Ф-6-Ф, умноженному на 2,5, так как авторами доказано, что количество гексозо-6-фосфата в любой момент реакции в 2,5 раза больше количества фруктозо-6-фосфата вследствие присутствия в инкуба-

пионной смеси фосфогексоизомеразы. Количество Ф-6-Ф находят по стандартной кривой, составляемой при помощи чистого Ф-6-Ф или, за неимением этого реактива, чистой фруктозы. Ф-6-Ф дает при пользовании этим методом только 60,5% интенсивности окрашивания равновесного количества фруктозы, так что искомое количество образовавшегося Ф-6-Ф получают, умножая найденное по стандартной кривой количество фруктозы на коэффициент 2,39; при этом учитывают разницу молекулярного веса обоих соединений (т. е. фруктозы и Ф-6-Ф).

Средняя активность в норме равна 0,5 единицы (0,1—1,41). Намного выше активность в сыворотке некоторых животных. Точность метода порядка 5%.

Определение рибозофосфат-изомеразы [13]

(рибозофосфоизомераза: КФ 5.3.1.6)

П р и н ц и п. Метод основан на колориметрическом определении количества D-рибулозо-5-фосфата (Ри-5-Ф), образующегося при воздействии фермента на рибозо-5-фосфат (Р-5-Ф), при помощи реакции с карбазолом по Дише.

Р е а к т и в ы: 1) трис-буферный раствор 0,1 *М*, pH 7,5; 2) 0,03 *М* раствор Р-5-Ф, pH 7,5: натриевую соль Р-5-Ф получают из бариевой соли путем осаждения бария сернокислым натрием. Содержание Р-5-Ф в растворе определяют по методу Мейбаум [13а]; 3) 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты; 4) раствор H_2SO_4 (225 *мл* концентрированной H_2SO_4 + 95 *мл* H_2O); 5) 1,5%-ный раствор карбазола в абсолютном этаноле.

Т е х н и к а. Инкубируют в течение 10 мин. при 37° 0,25 *мл* сыворотки с 0,25 *мл* H_2O, 0,5 *мл* раствора трис-буфера и 0,5 *мл* субстрата. Реакцию прекращают добавлением 1,5 *мл* раствора трихлоруксусной кислоты. В параллельной холостой пробе трихлоруксусную кислоту добавляют до введения субстрата. К 1 *мл* фильтрата, после добавления трихлоруксусной кислоты, приливают 6 *мл* раствора серной кислоты, 0,2 *мл* раствора цистеина и 0,2 *мл* раствора карбазола. Добавление реактивов продолжатеся 40 сек., после чего возникает красно-фиолетовое окрашивание с максимумом поглощения при 540 *ммк*. Максимум окрашивания появляется через 3 часа пребывания в водяной бане, при 37°. Пробы охлаждают и колориметрируют при 540 *ммк*.

Активность фермента выражают числом микромолей Ри-5-Ф (1 *мкмоль* Ри-5-Ф = 230 *мкг* Ри-5-Ф), образующегося при воздействии в течение часа 1,0 *мл* сыворотки на субстрат при pH 7,5 и температуре 37°. Приготовление стандарта для описанного метода представляет некоторые затруднения. Лучше всего было бы отсчитать количество полученного Ри-5-Ф по стандартной кривой, составленной при помощи чистого Ри-5-Ф. Однако этот реактив довольно трудно достать. Стандартную кривую можно также построить следующим образом: на координаты наносят показания фотометра

для количества Ри-5-Ф в реакционной смеси, при которых достигается состояние равновесия (показания фотометра не меняются). Ввиду того что в состоянии равновесия пропорция Р-5-Ф: Ри-5-Ф = 75 : 25, можно на основании исходного количества Р-5-Ф вычислить количество Ри-5-Ф, находящегося в смеси.

Другим способом стандартизации метода является хроматографическое разделение продуктов реакции. В системе этанол—борная кислота 1 : 2 (80%-ный этанол с 0,64%-ным раствором борной кислоты) Р-5-Ф имеет R_f 0,23—0,27, а Ри-5-Ф — R_f 0,44—0,49. Оба эфира локализуют на бумажных хроматограммах и в части фильтрата определяют интенсивность реакции с карбазолом, сравнивая с содержанием фосфора в сложном эфире, изолированном хроматографически, тем самым определяют количество Ри-5-Ф.

Активность фермента у здоровых лиц в среднем равнялась 3,5 *мкмолей* Ри-5-Ф на 1 *мл* сыворотки в 1 час. Не обнаружено различий в активности в зависимости от пола и возраста. Эритроциты весьма богаты этим ферментом; активность фермента в них в 1000 раз выше активности в сыворотке. Меньшей активностью фермента, чем эритроциты, отличаются почки, печень, миокард и скелетные мышцы. Термическая инактивация происходит при температуре выше 60°. Фермент имеется также в спинномозговой жидкости. Точность метода 5—8%.

Определение активности фосфогексоизомеразы [14]

(глюкозофосфатизомераза: КФ 5.3.1.9)

П р и н ц и п. Определение активности состоит в измерении количества получаемого фруктозо-6-фосфата (Ф-6-Ф) после воздействия фермента на субстрат, которым является глюкозо-6-фосфат (Г-6-Ф).

Р е а к т и в ы: 1) 0,03 *М* раствор Г-6-Ф: 782 *мг* бариевой соли Г-6-Ф с суммарной формулой $C_6H_{11}O_9PBa \cdot 7H_2O$ суспендируют в небольшом количестве дистиллированной воды и растворяют, прибавляя по каплям концентрированную HCl. Приливают около 16 *мл* воды и $BaSO_4$ отделяют центрифугированием. Надосадочную жидкость переносят в другую посуду и доводят ее pH раствором едкого натра до 7,4. Объем раствора доводят до 50 *мл*, добавляя воду, и проверяют его концентрацию, определяя общее количество связанного фосфора; 2) вероналацетатный буфер: 9,714 *г* уксуснокислого натрия ($CH_3COO\,Na \cdot 3H_2O$) и 14,714 *г* вероналнатрия растворяют в мерной колбе и доводят объем раствора дистиллированной водой до 500 *мл*; 3) смесь буфера и субстрата: в мерную колбу емкостью 500 *мл* отмеряют 125 *мл* 0,1 н. раствора HCl, 125 *мл* вероналацетатной смеси и 41,65 *мл* 0,03 *М* раствора Г-6-Ф. Объем раствора доводят до 500 *мл*. Окончательная концентрация Г-6-Ф должна равняться 0,0025 *М*, а pH раствора должен быть равным 7,4. Если концентрация раствора ниже, ее доводят до желаемой величины первичным раствором Г-6-Ф.

Таблица для пересчета количества фруктозо-6-фосфата, образующегося при ферментативной реакции, на единицы по Бодански *

Ф-6-Ф, *мкг*	ФГИ, единицы	Ф-6-Ф, *мкг*	ФГИ, единицы	Ф-6-Ф, *мкг*	ФГИ, единицы	Ф-6-Ф, *мкг*	ФГИ, единицы
1	1	36	36	71	84	106	161
2	2	37	37	72	86	107	163
3	3	38	38	73	88	108	166
4	4	39	39	74	90	109	170
5	5	40	40	75	92	110	172
6	6	41	41	76	93	111	176
7	7	42	42	77	94	112	179
8	8	43	43	78	97	113	182
9	9	44	44	79	99	114	186
10	10	45	45	80	100	115	190
11	11	46	46	81	101	116	194
12	12	47	47	82	103	117	198
13	13	48	48	83	106	118	202
14	14	49	50	84	107	119	206
15	15	50	51	85	109	120	208
16	16	51	52	86	111	121	212
17	17	52	54	87	113	122	216
18	18	53	55	88	115	123	220
19	19	54	56	89	117	124	224
20	20	55	58	90	120	125	229
21	21	56	60	91	122	126	234
22	22	57	61	92	123	127	240
23	23	58	62	93	126	128	245
24	24	59	64	94	128	129	252
25	25	60	66	95	131	130	257
26	26	61	67	96	133	131	264
27	27	62	69	97	136	132	272
28	28	63	70	98	139	133	278
29	29	64	72	99	141	134	286
30	30	65	74	100	144	135	293
31	31	66	76	101	147	136	300
32	32	67	78	102	149	137	307
33	33	68	80	103	153	138	314
34	34	69	81	104	155	139	321
35	35	70	84	105	158	140	331

* Таблица облегчает пересчет количества Ф-6-Ф в *мкг* на единицы активности ФГИ.

Техника. 0,05 *мл* сыворотки смешивают с 2 *мл* физиологического раствора (0,9%-ный раствор NaCl). В центрифужную пробирку отмеряют 2 *мл* раствора (3) и ставят в водяную баню (37°). Реакция пускается в ход прибавлением 0,5 *мл* разбавленной сыворотки. Инкубируют 30 мин. и прерывают реакцию добавлением 2,5 *мл* 5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Центрифугируют. Холостая проба содержит те же ингредиенты, но сыворотку приливают после добавления трихлоруксусной кислоты. 2 *мл* отцентрифугированной жидкости отмеряют в пробирку и определяют Ф-6-Ф, прибавляя 2 *мл* 0,1%-ного раствора резорцина в абсолютном этаноле и 6 *мл* 10 н. раствора HCl. Содержимое пробирки перемешивают и подогревают 15 мин. При 80°. Фотометрируют после охлаждения, при 490 *ммк*, сравнивая с холостыми пробами. Количество образующегося Ф-6-Ф находят по стандартной кривой, составляемой по чистому Ф-6-Ф или чистой фруктозе. В последнем случае получаемое количество фруктозы умножают на коэффициент 2,39.

При большой активности фермента в пробах весь субстрат может быть израсходован в ходе реакции. В таком случае повторяют опыт с сывороткой, разбавленной в 20 или 40 раз, а результат соответственно умножают на 4 или 8. Активность ФГИ выражают в единицах, равных обратной величине количества сыворотки в *мл* на 1 *мл* реактивной смеси, обусловливающей образование 25 *мкг* Ф-6-Ф при заданных условиях. Например, активность 167 единиц для данной сыворотки означает, что 1/167 $см^{-1}$ или 0,006 *мл* этой сыворотки вызвало бы образование 25 *мкг* Ф-6-Ф при стандартных условиях.

Активность сыворотки не изменяется за 8 час. хранения при комнатной температуре или за 1—2 недели в холодильнике. Активность фермента в норме равняется 20 единицам (от 8 до 40). Активность фермента в легких в 270 раз выше, чем в сыворотке, а в мозге, печени, мышцах и костях соответственно в 480, 1120, 1120 и 650 раз выше.

Для определения активности ФГИ в спинномозговой жидкости [15] 1,5 *мл* забуференного субстрата и 0,5 *мл* спинномозговой жидкости инкубируют при 37,5° в течение 60 мин. Затем прерывают реакцию, прибавляя 6 *мл* 30%-ного раствора HCl. Прибавляют 2 *мл* раствора резорцина, тщательно перемешивают и подогревают 15 мин. при 80°. По истечении этого срока пробы охлаждают и фотометрируют аппаратом Пульфриха с фильтром S_{50} (500 *ммк*) и кюветами толщиной 2 *см*. Холостая проба содержит смесь тех же компонентов, но без инкубации. Количество образующегося Ф-6-Ф вычисляют на основании разности экстинкций холостой и исследуемой проб. Активность фермента, выраженная в единицах, равняется числу *мкг* Ф-6-Ф, получаемому при воздействии 0,5 *мл* жидкости на субстрат в продолжение часа при указанных условиях. Активность фермента в биологических жидкостях в физиологических условиях составляет до 80 *мкг* Ф-6-Ф/*мл*.

Весьма малое количество белка в спинномозговой жидкости облегчает определение, так как нет необходимости осаждать белок перед определением Ф-6-Ф. Прибавление, по окончании инкубации, концентрированной соляной кислоты немедленно приостанавливает ферментативную реакцию. У жидкостей с большой активностью ФГИ, которые при инкубации с субстратом в продолжение 1 часа вызывают образование более чем 100 *мкг* Ф-6-Ф, рекомендуется повторить определение, разбавив исходную жидкость физиологическим раствором (с учетом степени разведения при окончательном вычислении). Точность метода 5%.

Определение сорбитдегидрогеназы [16]

(см. алкогольдегидрогеназа: КФ 1.1.1.1)

Сорбитдегидрогеназа содержится в печени многих млекопитающих. Показано присутствие ее также и в половых органах. Печень человека характеризуется очень большим содержанием сорбитдегидрогеназы. Содержание фермента в других органах приводится в таблице.

Сыворотка и гемолизированная цельная кровь здорового человека содержит следы сорбитдегидрогеназы. Этот фермент называется также полиолдегидрогеназой.

Активность сорбитдегидрогеназы в органах человека (по результатам исследований материала, полученного при вскрытии)

Биологический материал	Активность сорбитдегидрогеназы, *ед/мг*	
	сырой вес	сухой вес
Печень	5,732	29,60
Простата	1,366	8,46
Почка	1,240	5,79
Молоко	0,453	2,07
	0,190	1,28
Лимфатические узлы	0,212	0,93
Левый желудочек сердца	0,100	0,56
Скелетная мышца	0,113	0,49

Нижеприводимую реакцию цитоплазматической сорбитдегидрогеназы, протекающую при участии специфической к НАДФ альдозо-редуктазы, можно рассматривать как ее физиологическую функцию:

$$D\text{-глюкоза} + \text{НАДФ-Н} + H^+ \rightleftarrows D\text{-сорбит} + \text{НАДФ}^+; \quad (1)$$

$$D\text{-сорбит} + \text{НАД} \xrightleftharpoons{\text{сорбитдегидрогеназа}} D\text{-фруктоза} + \text{НАД-Н} + H^+. \quad (2)$$

На основании опытных данных ставится под сомнение наличие сорбитдегидрогеназы в сыворотке здоровых людей. Однако при повреждении клеток печени (инфекция токсического или гипоксического вида) сразу же устанавливается ее содержание. Исходя из этого, активность сорбитдегидрогеназы может иметь значение почти специфического индикатора при повреждении клеток печени и, следовательно, может быть использована в клинике в диагностических целях.

Принцип. Принцип определения вытекает из уравнения (2). Для измерения активности сорбитдегидрогеназы в сыворотке желательно использование фруктозы в качестве субстрата. Временное уменьшение экстинкции НАД при 340 или 366 *ммк* является мерилом активности сорбитдегидрогеназы.

Оптимальные условия измерения. pH реакции с фруктозой в триэтаноламиновом буфере и трис-гидроксиметиламинометановом буфере равно 6,1. Реакция в трис-буфере протекает немного быстрее, чем в триэтаноламиновом буфере, но в трис-буфере требуются более высокие концентрации фруктозы для насыщения фермента. Реакция, катализируемая сорбитдегидрогеназой в различных буферах с НАД, протекает на 10—20% быстрее, чем с НАДФ, повышение измеряемой температуры на 10° (между 20 и 35°) увеличивает скорость реакции в полтора раза (на 150%). Ниже описываются приблизительно оптимальные и технически благоприятные условия для определения активности этого фермента в сыворотках человека при различных заболеваниях.

Реактивы: 1) триэтаноламиновый буферный раствор (0,2 *M*, pH 7,4): 3,72 *г* гидрохлорида триэтаноламина растворяют приблизительно в 80 *мл* дистиллированной воды, добавляют 7,2 *мл* 2 н. раствора едкого натра, смешивают и дополняют дистиллированной водой до 100 *мл*. Значение pH контролируют pH-метром со стеклянным электродом; 2) восстановленный никотинамидадениндинуклеотид ($1{,}2 \cdot 10^{-2}$ *M* раствор β-НАД-H_2): 15 *мг* натриевой соли НАД-H_2(НАД-H-Na) растворят в 1%-ном растворе двууглекислой соды; 3) *D*-фруктоза (72%-ный раствор в/о): 72 *г* фруктозы растворяют в дистиллированной воде, объем доводят до 100 *мл*.

Стойкость реактивов. Раствор НАД-H_2 надо готовить еженедельно, другие растворы стойки долгое время, если они не загрязняются микроорганизмами.

Техника. Экстинкцию измеряют при 340 или 366 *ммк*, толщина слоя 1 *см*, измеряемый объем 3 *мл*, температура 24°, измерение проводят против воздуха или воды. К каждой серии опыта ставят пустой опыт (с водой вместо сыворотки). В опытную кювету последовательно отмеряют: 1,6—2,4 *мл* триэтаноламинового буфера (1), 0,1 *мл* раствора НАД-H_2(2), 0,2—1,0 *мл* сыворотки, оставляют в покое приблизительно 30 мин., пока экстинкция не меняется (метаболиты сыворотки при потреблении НАД-H_2 реагируют с характерными дегидрогеназами сыворотки). При добавлении 0,3 *мл* раствора фруктозы начинается реакция сорбитдегидрогеназы. От-

считывают экстинкцию в течение 5—8 мин. через каждые 30 или 60 сек.

Вычисление. Единица активности — это то количество фермента, которое в 3 *мл* опытной пробы при толщине слоя 1 *см*, при 24° и при 366 *ммк* способствует изменению экстинкции на 0,001 в минуту. Эти, за каждые 30 сек. отсчитанные изменения экстинкции ΔE умножают на 2; из полученных значений, или же из значений, отсчитанных прямо за 60 секунд, выводят средние. Согласно определению единицы активности принимаем

$$\Delta E^{60\ сек.}_{366\ ммк} \cdot 1000 = \text{единицам сорбитдегидрогеназы/опытная проба.}$$

Для вычисления единицы на 1 *мл* сыворотки следует полученную величину разделить на количество сыворотки, взятое для пробы.

В указанных условиях активность фермента пропорциональна данному количеству сыворотки; экстинкция меняется линейно времени; при определении с сывороткой в двойной повторности, смотря по активности пробы, ошибка составляет до 3%.

Умножением единиц сорбитдегидрогеназы в 1 *мл* сыворотки на фактор (см. [22], стр. 763) 0,0545 получают активность сорбитдегидрогеназы в *мкмолях* субстрата на 1 *мл* сыворотки за час при 24°. Активность сорбитдегидрогеназы в сыворотке здоровых людей $<$ 1 *ед/мл*.

Стабильность фермента в пробе сыворотки. Фермент в сыворотке относительно термолабилен. О снижении активности при различных температурах дает представление следующая таблица.

Стабильность сорбитдегидрогеназы в сыворотке при различных температурах. Исходные значения—активность свежей сыворотки

Время хранения, часы	Потеря активности (в % от исходного значения) после хранения пробы сыворотки при $t°$		
	+21	+4	−18
24	20,5	5,5	0
48	49	10,6	0

Источники ошибок. Активность сорбитдегидрогеназы тормозится этилендиамин-тетраацетатом и ионами ртути; меркаптаны, борат натрия, монойодацетат и KCN уменьшают активность этого фермента в печени крысы; гепарин не оказывает существенного влияния на активность сорбитдегидрогеназы.

Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

Определение лактатдегидрогеназы (ЛДГ) [17]

(КФ 1.1.1.27)

П р и н ц и п. Пробу инкубируют с пируватом и НАД-H_2, измеряют понижение поглощения НАД-H_2 при 340 *ммк*. За единицу ЛДГ-ной активности принимают уменьшение экстинкции (ΔE) на 0,001 (*мин/мл* сыворотки при 32° в условиях опыта).

Р е а к т и в ы: 1) фосфатный буфер, 1 *М* раствор, pH 7,4: 136 *г* KH_2PO_4 и 33 *г* NaOH в литре водного раствора; 2) фосфатный буфер, 0,1 *М* раствор pH 7,4. Готовят разведением 1 *М* буфера; 3) раствор НАД-H_2 2,5 *мг/мл* 0,1 н. раствора фосфатного буфера. В замороженном виде можно хранить в течение недели (продажный препарат 85—100% чистоты); 4) раствор пировинограднокислого натрия. 1 *мг/мл* 0,1 *М* раствора фосфатного буфера. В холодильнике этот реактив стабилен в течение не менее 3 месяцев; 5) пустой опыт с бихроматом. 0,001 *М* раствор (основной): растворяют 29 *мг* $K_2Cr_2O_7$ в 100 *мл* воды и добавляют несколько капель концентрированной серной кислоты. Серию пустых опытов ставят разведением основного раствора. Для всех случаев нужны следующие четыре разведения: 0,00025, 0,000187, 0,000125 и 0,0000625 *М*.

Т е х н и к а. В кювету (толщина слоя 1 *см*) пипеткой отмеряют: 2,5 *мл* 0,1 *М* раствора фосфатного буфера, 0,2 *мл* раствора НАД-H_2 и 0,1 *мл* сыворотки или спинномозговой жидкости. Инкубируют 20 мин. в спектрофотометре (смесь можно инкубировать в маленьких реакционных пробирках в водяной бане). Подбирают бихроматный пустой опыт для установки спектрофотометра при нулевом поглощении так, чтобы кюветы с исследуемой жидкостью отсчитывались между 0,4 и 0,6 при 340 *ммк*. Показания нужно проверять через 2 мин. до получения постоянных показателей, чем доказывается отсутствие эндогенных кето- и дикетокислот. В кювету, установленную в спектрофотометре, добавляют 0,2 *мл* пирувата натрия, нагретого до 32°, быстро перемешивают палочкой и закрывают крышкой. Одновременно включают секундомер. Отсчитывают экстинкцию *E* каждую минуту, начиная с 1 мин. после того, как реакция началась, в течение 6 мин. Если скорость настолько высока, что нельзя делать несколько отсчетов до получения нулевого поглощения, опыт проводят снова с разведенной буфером сывороткой. ΔE/*мин* на протяжении такого интервала времени не должна давать значительных изменений.

Вычисление:

$$\text{Единицы ЛДГ (см. стр. 589)} = \frac{\Delta E \text{ для } T_{\text{мин}}}{T} \times \frac{1}{\text{мл пробы}} \cdot 1000.$$

И с т о ч н и к и о ш и б о к. 1. Температура реакции и использование спектрофотометра. Наиболее подходящей температурой для определения ЛДГ является 32°. На стр. 589 даны формула и коэффициент для поправки, которую нужно вносить при проведении анализа при других температурах. Для сравнения приведены также данные для АЛТ и АСТ.

Единицы при 32° = f × един., полученные при температуре t°.

Коэффициенты поправки для ЛДГ (32°)

Температура реакции, t°	Коэффициент f			Температура реакции, °t	Коэффициент f		
	ЛДГ	АЛТ *	АСТ **		ЛДГ	АЛТ*	АСТ**
25	1,67	1,59	1,57	33	0,93	0,94	0,94
26	1,55	1,48	1,47	34	0,87	0,88	0,88
27	1,44	1,39	1,38	35	0,81	0,82	0,83
28	1,34	1,30	1,29	36	0,75	0,77	0,78
29	1,24	1,22	1,21	37	0,70	0,73	0,73
30	1,16	1,14	1,13	38	0,65	0,68	0,69
31	1,07	1,07	1,06	39	0,61	0,64	0,65
32	1,00	1,00	1,00	40	0,57	0,60	0,61

* АЛТ — глутамикоаланиновая аминофераза

** АСТ — глутамикоаспарагиновая аминофераза.

2. Изменение скорости реакции за время опыта. Скорость реакции прямолинейна в первые 6—7 мин., после чего она начинает падать так, что через 10—15 мин. составляет лишь 25% начальной скорости. Причина этого явления не раскрыта.

3. Сыворотка — плазма. Было обнаружено, что оксалат ингибирует ЛДГ, а гепарин — не мешает анализу. По данным же других авторов (Hsien K. M. a. Blumenthal H.T. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1956, **91**, 626), в гепаринизированной и оксалатной крови активность на 50% выше по сравнению с сывороткой.

4. Гемолиз. Содержание ЛДГ в 100 раз выше в эритроцитах, чем в сыворотке. Вычисления показали, что едва заметный гемолиз, т. е. 50 *мг* гемоглобина в 100 *мл* сыворотки, дает на 15—20% повышенные результаты.

5. Единицы. Некоторые авторы предлагают выражать активность в *мкмолях* субстрата, превращенного в *мл* пробы за час. Сравнение этих единиц с единицами, которыми пользуются авторы, дает следующее:

$$\text{мкмоли/мл/час} = 0{,}029 \times \Delta A \times 1000/\text{мин/мл}.$$

$$\Delta A \times 1000/\text{мин/мл} = 34{,}5 \times \text{мкмоли/мл/час}.$$

Для выражения результатов в *мкмоль/мин/мл* сыворотки ЛДГ «единицы» умножают на $4{,}83 \times 10^{-4}$.

Разными авторами наблюдалась различная стойкость сывороточной ЛДГ при комнатной температуре и в холодильнике. Причину этого можно выявить на основании тщательных исследований. Было показано, что в 80% случаев сывороточная ЛДГ сохраняет активность в течение 8 дней при комнатной температуре и в течение 7 дней при 37°, в то время как в 20% случаев сыворотка не была

устойчива. Исследование активности сывороточной ЛДГ 30 нормальных и больных людей при 25 и 4° и в замороженном состоянии дало неожиданные результаты: при комнатной температуре существенного понижения активности не наблюдалось ни в одном из случаев, но изредка отмечалось значительное падение активности в сыворотке, которая хранилась при более низких температурах.

При хранении крови для свертывания в течение 1 часа при комнатной температуре активность сывороточной ЛДГ повышается на 25% за счет свернувшихся эритроцитов.

Спинномозговая жидкость стабильна лишь в течение 6 час. при комнатной температуре и в течение 2 недель при 4°.

Точность метода ±6%.

Активность ЛДГ, определенная вышеописанным методом, составляет у мужчин и женщин 233—442 и 208—242 единиц соответственно. У детей и подростков активность выше, чем у взрослых. С менструальным циклом связаны циклические 100%-ные отклонения: активность наименьшая на первые 10 дней цикла, наивысшая от 17 до 30 дней. Нормальная активность ЛДГ спинномозговой жидкости от 17 до 71 единицы.

Электрофоретический анализ сывороточных лактатдегидрогеназ [*18*]

(КФ 1.1.1.27; 1.1.2.3; 1.1.2.28; 1.1.2.4)

Принцип. Метод основан на разделении сывороточных лактатдегидрогеназ электрофорезом на агаре. Для обнаружения и количественного определения полученных изомеров используют реакцию с раствором тетразол нитроголубого. Оптическая плотность продуктов реакции пропорциональна активности фермента.

Реактивы: 1) агар, 0,4%-ный раствор в электрофоретическом буфере; 2) электрофоретический буфер: смешивают равные объемы (по 100 *мл*) 0,05 *М* раствор глицина и 0,031 *М* раствор хлористого лития, разбавляют водой до 1 *л*, pH раствора доводят до 8,7 раствором едкого натра; 3) хроматографическая бумага Ватман № 17. Для нанесения сыворотки используют полоски бумаги шириной 1,5 *мм* и длиной 1 *см*; 4) субстрат тетразол нитроголубого: раствор приготовляют смешиванием следующих компонентов: а) 28 *мл* 0,05 *М* раствора трис-(гидроксиметил)-аминометанового буфера, pH 7,4; б) 2,5 *мл* 0,06 *М* раствора цианистого калия в трис-буферном растворе; в) 0,84 *мл* 40%-ного раствора лактата натрия; г) 0,3 *мл* раствора, содержащего 2 *мг/мл* метасульфита феназина; может храниться в течение двух недель на холоде; д) 20 *мг* никотинамидадениндинуклеотида; е) 15 *мл* 2%-ного раствора тетразольного раствора нитроголубого.

Техника. Для проведения электрофореза применяется несколько усовершенствованный методРесслера и Моя. Агар растворяют в минимальном количестве буфера и горячий раствор выливают в оставшийся буферный раствор так, чтобы температура рас-

твора была 37—40°. Во время нагревания агара вырезанные полоски бумаги увлажняют сывороткой, подлежащей анализу. Агаровый раствор вливают в аппарат, куда сразу же помещают мокрые бумажные полоски. Отдельную пробу сыворотки наносят на агар для определения местоположения фронта по окраске с бромфеноловым синим. Для проведения электрофореза применяют градиент в 6 *в/см*. После достаточного разделения изомеров, которое требует приблизительно 4 час., ток выключают, прибавляют тетразольный раствор нитроголубого по каплям, так чтобы область движения белка была покрыта полностью. Аппарат закрывают на 1 час крышкой, которую затем удаляют, агар высушивают при комнатной температуре, оставляя аппарат незакрытым на ночь. Сушку можно ускорить, применив вентилятор. Пластинку, содержащую изомеры, промывают в течение 15 мин. раствором, содержащим 50% спирта, 40% воды и 10% ледяной уксусной кислоты. Пластинку высушивают при комнатной температуре и вырезают из нее отдельные полосы для денситометрического измерения.

Метод легко воспроизводим; чувствительность достаточна для определения пяти изомеров в одной сыворотке. За 1 час работы могут быть разделены и обнаружены 12 образцов и даже больше.

ЛДГ разделена на 5 изоэнзимов при использовании мединалового буфера и на 9 изоэнзимов при проведении анализа в боратном буфере [18]. Аналогичные исследования были проведены методом электрофореза на бумаге, в агаровом геле, и в крахмальном блоке. Разные ткани содержат один или несколько изоэнзимов ЛДГ и каждая ткань характеризуется содержанием определенных изоферментов. Анализ ЛДГ-ной активности разделенных фракций показал бо́льшую специфичность в локализации патологии, чем анализ общей ЛДГ-ной активности сыворотки. Наиболее подходящим является дифференциация изоферментов по чувствительности к нагреванию. Так, например, сердечная ЛДГ относительно термостабильна, а печеночная — очень лабильна. Требуется анализ ЛДГ до и после инкубации сыворотки при 65° в течение 30 мин. для того, чтобы выявить, какой из изоферментов преобладает в анализируемой пробе.

Исследованиями авторов [18] это не подтвердилось. Повышение активности ЛДГ сыворотки при инфаркте миокарда можно дифференцировать от такового при гепатитах абсорбцией на ДЕАЕ целлюлозе [19].

Определение дегидрогеназы молочной кислоты [20]

(лактатдегидрогеназа: КФ 1.1.1.27)

П р и н ц и п. Дегидрогеназа молочной кислоты (ЛДГ) в присутствии никотинамидадениндинуклеотида (НАД) катализирует реакцию восстановления пировиноградной кислоты в молочную; одновременно восстанавливается стехиометрическое количество добавленной тетразолиевой соли, переходя в окрашенную форму; коли-

чество последней определяется спектрофотометрически. В качестве промежуточного переносчика электронов в реакционную смесь добавляется метасульфат феназина.

Реактивы: 1) солянокислый 2-*п*-иодофенил-3-*п*-нитрофенил-5-фенилтетразолий (ИНТ). В предварительном опыте определяется то количество реактива, которое восстанавливается при добавлении определенного количества метасульфата феназина в присутствии исследуемого материала, содержащего некоторое количество аскорбиновой кислоты, реагирующей с ИНТ и без добавления феназина. В достаточно широком интервале концентраций аскорбиновой кислоты и в отношении различных образцов исследуемой сыворотки оптимальным является 0,4 *мг* ИНТ; 2) дифосфопиридинникотинамидадениндинуклеотид (НАД); 3) метасульфат феназина (МФ); 4) реактив на дегидрогеназу молочной кислоты: 50 *мг* ИНТ растворяют в 15 *мл* воды, для чего требуется длительное перемешивание магнитной мешалкой или растирание стеклянной палочкой. К полученному раствору добавляют 125 *мг* НАД и, наконец, 12,5 *мг* ФМС. Смесь переносят в 25 *мл* мерную колбу и доливают водой до метки; реактив светочувствителен. В холодильнике без доступа света реактив может сохраняться в течение нескольких недель; 5) буферный раствор: 1 *г* этоксилированного олеинового алкоголя растворяют в 10 *мл* воды при нагревании до 95°, затем разбавляют до 50 *мл* и добавляют 12,1 *г* триса. Реакцию раствора доводят до pH 8,2 3 н. раствором соляной кислоты и доливают водой до объема 1000 *мл*; сохраняют в холодильнике. При обнаружении признаков роста бактерий заменяют свежим. При определении активности дегидрогеназы молочной кислоты в сыворотке крови олеиновый алкоголь можно не добавлять; 6) субстрат: 5 *мл* 20%-ного раствора L-(+) молочной кислоты разбавляют водой до 50 *мл*. Реакцию раствора доводят до pH 5,5 добавлением 1 н. раствора едкого натра и затем разбавляют водой до 120 *мл*, вносят несколько капель хлороформа и сохраняют в холодильнике; 7) контрольный реактив: 0,2 *г* щавелевокислого калия и 0,2 *г* этилендиаминтетраацетата (двуметаллический дигидрат) растворяют в 100 *мл* воды; 8) 0,1 н. раствор соляной кислоты.

Техника. В две пробирки наливают по 0,1 *мл* исследуемого материала (сыворотки) и по 0,2 *мл* буферного раствора. В одну из пробирок добавляют 0,5 *мл* субстрата (6), а в другую — 0,5 *мл* раствора контрольного реактива (7). Содержимое пробирок перемешивают, и пробирки нагревают до 37°. Точно отметив время, добавляют 0,2 *мл* реактива на дегидрогеназу молочной кислоты (соблюдая интервал времени между внесением реактива в опытную и контрольную пробы —4) и немедленно погружают вновь в водяную баню. Через 5 мин. (точно) добавляют по 5 *мл* 0,1 н. раствора соляной кислоты и перемешивают. Определяют разность оптической плотности между опытной и контрольной пробами в интервале 500—540 *ммк*. Измерение оптической плотности должно быть произведено не позже 20 мин. после остановки реакции. В зависимости

от применяемого спектрофотометра количество соляной кислоты, добавляемой для остановки ферментативной реакции, может несколько варьировать, однако оно не должно быть меньше 2 *мл*.

Точно таким же способом определяется активность стандартного раствора дегидрогеназы молочной кислоты; полученные данные используются для построения калибровочной кривой. Окраска реакционной смеси изменяется линейно с изменением концентрации фермента. Активность дегидрогеназы молочной кислоты выражается по Нахлас и др. [20а] в *мкг* образовавшегося формазана.

Источники ошибок. Различные изоферменты дегидрогеназы молочной кислоты могут требовать различных условий для проявления оптимального действия, несоблюдение которых приведет к существенным ошибкам. С другой стороны, это различие может быть использовано в качестве наиболее доступной характеристики изоферментов, содержащихся в тканях.

Данных о проверке метода другими лабораториями пока не имеется.

Электрофоретическое определение изодегидрогеназы молочной кислоты [21]

(см. стр. 591, дегидрогеназа молочной кислоты)

Принцип. Изодегидрогеназа молочной кислоты катализирует окисление лактата; одновременно восстанавливается стехиометрическое количество тетразолиевой соли, превращаясь в формазан пурпурного цвета. Измеряя оптическую плотность цветных пятен, возникающих на электрофореграмме в местах действия фермента, определяют количество последнего.

Реактивы: 1) барбитал-барбитуратный буферный раствор (pH 8,6, ионная сила 0,052): растворяют 10,8 *г* диэтилбарбитурата натрия и 1,5 *г* диэтилбарбитуровой кислоты в дистиллированной воде и доводят объем до 1000 *мл*; 2) пирофосфорнокислый натрий, 0,05 *М* раствор, pH 8,8; 3) лактат натрия, 40%-ный сиропообразный раствор; 4) никотинамидадениндинуклеотид (НАД) в порошке; 5) тетранитротетразолиевый синий (ТНТС); 6) метасульфат феназина (МФ); 7) уксусная кислота, 5%-ный раствор (по объему) в дистиллированной воде; 8) ионообменник: полиацетат Сепрафор III, полоски 3 × 30,5 *см*.

Электрофоретический проявитель приготовляют непосредственно перед употреблением; для проявления 5—10 полосок достаточно 20 *мл* проявителя. 12 *мг* ТНТС растворяют в 12 *мл* 0,05 *М* раствора пирофосфорнокислого натрия, раствор фильтруют, к фильтрату добавляют 0,25 *мл* 40%-ного раствора лактата натрия. К этому раствору добавляют 7 *мг* НАД и объем доводят до 19 *мл*, доливая 0,05 *М* раствором пирофосфорнокислого натрия. Непосредственно перед проявлением полосок проявитель переливают в чашки Петри и добавляют 1 *мл* раствора МФ. Проявитель не должен находиться на свету дольше 3 мин., поскольку МФ светочувствителен; для полу-

чения отчетливого изображения пятна концентрация МФ в проявителе не должна быть ниже 10—50 *мкг/мл*.

Техника. Полоски Сепрафора III предварительно вымачивают в барбитуратном буфере не менее 15 мин. и затем помещают в рамку аппарата для электрофореза. По прошествии 20 мин., необходимых для уравновешивания системы, наносят на стартовую линию 10 *мкл* исследуемого материала, электрофорез ведут при напряжении 200 *в* в течение 1,5 часа. По окончании разделения полоски достают из электрофоретической камеры, опускают на 15 сек. в проявитель и затем помещают на стеклянные пластинки, покрывая сверху такими же пластинками для предохранения от воздействия кислорода. Полоски инкубируют в темноте при комнатной температуре в течение 30 мин., просветляют в 5%-ном растворе уксусной кислоты в течение 5 мин. и высушивают между листами фильтровальной бумаги. Затем полоски помещают в денситометр, автоматически регистрирующий как оптическую плотность пятен, так и площадь, занимаемую отдельными пятнами.

Вычисление. Площадь, занимаемая каждым пятном, рассчитывают в процентах путем деления числа компонентов каждой фракции на денситограмме на общее число компонентов.

Данных о проверке метода другими лабораториями пока не имеется.

Определение малатдегидрогеназы (МДГ) [22]
(КФ 1.1.1.37)

Принцип. МДГ катализирует реакцию:

$$L\text{-малат} + \text{НАД}^+ \rightleftarrows \text{оксалацетат} + \text{НАД-Н} + \text{H}^+,$$

равновесие которой при нейтральном значении pH сдвинуто в левую сторону. Активность фермента измеряют с оксалацетатом в качестве субстрата и с НАД-H_2 — в качестве кофермента при 22° и pH 7,4. Ввиду того что оксалацетат в водном растворе нестабилен и частично декарбоксилируется также и в пируват, то при пользовании более старыми растворами оксалацетата одновременно частично измеряется и активность лактатдегидрогеназы сыворотки. Это затруднение удается обойти, если перед самым определением МДГ создать из α-кетоглутарата и *L*-аспартата (под действием глутаматоксалацетаттрансаминазы) в кювете оптимальную концентрацию оксалацетата. Количество оксалацетата, превращенное за единицу времени и измеренное по понижению экстинкции НАД-H_2, служит мерилом для активности МДГ.

Реактивы (примерно для 25 определений): 1) фосфат аспартат (0,1*М* фосфатный буферный раствор, pH 7,4); 4,2 · 10^{-2} *М* раствор аспартата: 0,2 *г* KH_2PO_4 + 1,5 *г* K_2HPO_4 + 0,66 *г* Na-*L*-аспартата или 0,56 *г* *L*-аспарагиновой кислоты растворяют в 50 *мл* воды, устанавливают при помощи 0,1 н. раствора NaOH pH равным 7,4 и доливают бидистиллированной водой до 100 *мл*; 2) α-кетоглу-

тарат ($6 \cdot 10^{-2}$ *M* раствор): 17 *мг* Na-α-кетоглутарата растворяют в 1,5 *мл* бидистиллированной воды или 13 *мг* α-кетоглутаровой кислоты растворяют примерно в 1 *мл* бидистиллированной воды, нейтрализуют приблизительно 0,2 *мл* 0,1 н. раствора NaOH, доливают бидистиллированной водой до 1,5 *мл*; 3) восстановленный никотинамидадениндинуклеотид ($1,2 \times 10^{-2}$ *M* β-НАД-H_2): 15 *мг* НАД-Na_2 растворяют в 1,5 *мл* 1%-ного раствора $NaHCO_3$; 4) глутаматоксалацетаттрансаминаза – ГОТ (1 *мг* белка на 1 *мл*). Основную взвесь, если нужно, соответственно разводят 3 *M* раствором сульфата аммония.

Раствор фосфатаспартата устойчив до тех пор, пока в нем не начнут развиваться микроорганизмы. Растворы α-кетоглутарата и НАД-H_2 изготовляют ежедневно свежими. Взвесь ГОТ сохраняется несколько месяцев. Все реактивы хранят при 0—4°.

Техника. Применяют только свежий, негемолизированный материал.

Измерение ведут при 340 или 366 *ммк*, толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 3,00 *мл* (при 25°; термоконстантный держатель кюветы). Контрольный опыт не нужен. Измерения ведут против воздуха или кюветы с водой. В кювету последовательно отмеряют пипеткой: 2,75 *мл* раствора фосфатаспартата (1), 0,05 *мл* раствора α-кетоглутарата (2), 0,05 *мл* раствора НАД-H_2(3), 0.05 *мл* раствора ГОТ (4), смешивают уплощенной внизу стеклянной или пластмассовой палочкой и выжидают 5 мин. Количество аспартата, эквивалентное α-кетоглутарату, полностью переходит в оксалацетат. Добавляют 0,1 *мл* пробы (сыворотки, ликвора и т. п.), нажимают секундомер и в течение 5—10 мин. ежеминутно измеряют экстинкцию. Значение ΔE/мин при 366 *ммк* не должно быть большим 0,030. В противном случае разбавляют сыворотку в 5—10 раз раствором 1 или измеряют в более короткие интервалы времени.

Вычисление. По определению, принятому в американской литературе, единицей активности МДГ является количество фермента в 1 *мл* сыворотки, которое изменяет экстинкцию НАД-H_2 при 25° в 3 *мл* опыта в 1 мин. при 340 *ммк* на 0,001. Следовательно, при 0,1 *мл* сыворотки в опыте. $(\Delta E_{340/мин}) \cdot 1000 \cdot 10 = (\Delta E_{340/мин}) \cdot 10\,000 =$ = ед. МДГ в 1 *мл* сыворотки.

Для вычисления величины активности в указанных выше единицах результаты измерения при 366 *ммк*, согласно отношению коэффициентов экстинкции НАД-H_2 для 340 и 366 *ммк*, следует умножить на 1,89, т. е. $(\Delta E_{366/мин}) \cdot 18\,900 =$ ед. МДГ в 1 *мл* сыворотки.

Пример. Анализируют 0,1 *мл* нормальной сыворотки. Измеряют при 366 *ммк*:

0 мин. . . . 0,445 $\Delta E = 0,006$	3 мин. . . . 0,430 $\Delta E = 0,005$
1 » . . . . 0,439 $\Delta E = 0,005$	4 » . . . . 0,425 $\Delta E = 0,005$
2 » . . . . 0,434 $\Delta E = 0,004$	5 » . . . . 0,420 $\Delta E = 0,006$

Среднее значение $\Delta E_{366/мин} = 0,005$; $0,005 \cdot 18\,900 = 94$ ед. МДГ в 1 *мл* сыворотки.

Примечание. Фермент теряет в сыворотке за 24 часа при комнатной температуре около 17% своей активности, при 4° — около 11%, а замороженный — около 2%. При этом не учитывалось, насколько здесь играют роль сдвиги оптимальной концентрации субстрата, обусловленные старением фермента.

Источники ошибок (вследствие декарбоксилирования субстрата оксалацетата) были доведены до минимума благодаря описанной здесь постановке опыта. Так как имеющийся α-кетоглутарат полностью превращается под действием МДГ, то и глутаматдегидрогеназа не мешает анализу [23].

Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

Определение глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-Ф-ДГ) [24]

(КФ 1.1.1.49)

Принцип. Г-6-Ф-ДГ катализирует реакцию:

$$\text{глюкозо-6-фосфат} + \text{НАДФ}^+ \rightleftarrows \text{глюконовая кислота-6-фосфат} +$$
$$+ \text{НАДФ-Н} + \text{Н}^+$$

Образование НАДФ-H_2 является мерилом активности фермента; это можно проследить по абсорбции света при 340 или 366 *ммк*.

Оптимальные условия измерения. Оптимум pH для реакции с Г-6-Ф-ДГ для фермента из дрожжей и клеток крови лежит около 8,3. Между pH 7,4 и 8,6 активность фермента изменяется лишь незначительно. Измерение ведут при pH 7,5, потому что это наиболее соответствует физиологическим условиям и делает возможным сравнение с активностью фермента, измеренной при других значениях pH, большей частью при pH 7,5. Так как 0,1 *М* фосфат полностью ингибирует фермент, следует избегать фосфатного буферного раствора. Лучшим оказался буферный раствор 0,5 *М* триэтаноламина (pH 7,5) с 0,005 *М* этилендиаминтетраацетата. Определение активности в цитолизатах и клеточных гомогенатах не может быть очень точным; вследствие присутствия дегидрогеназы глюконовой кислоты-6-фосфата (дополнительное восстановление НАДФ) находят слишком высокие значения активности. Правда, реакции, окисляющие НАДФ-H_2(протекающие с участием глютатионредуктазы, *м*-гемоглобинредуктазы и других флавопротеинов), все это снова выравнивают, однако измерение активности Г-6-Ф-ДГ в биологическом материале остается неточным. Более точным, но и более сложным становится определение при удалении мешающей дегидрогеназы глюконовой кислоты-6-фосфата посредством абсорбции на геле $Ca_3(PO_4)_2$. Ионы магния активируют реакцию Г-6-Ф-ДГ в буферном растворе глицилглицина, но не в буферном растворе фосфата или триэтаноламина.

Реактивы: все реактивы готовят с водой, дистиллированной в кварцевой посуде.

Приготовление материала исследования.

Для эритроцитов: 1) цитрат (3,8%-ный раствор в/в): 3,8 *г* цитрата натрия растворяют в дистиллированной воде и объем доводят до 100 *мл*; 2) физиологический раствор поваренной соли (0,9% в/о): 9 *г* NaCl растворяют в дистиллированной воде, объем доводят до 1000 *мл*; 3) буферный раствор триэтаноламина (0,05 *М*, pH 7,6): 0,93 *г* триэтаноламингидрохлорида и 0,2 *г* ЭДТА-$Na_2H_2 \cdot 2H_2O$ растворяют приблизительно в 50 *мл* дистиллированной воды, при помощи 0,1 н. раствора NaOH доводят pH до 7,5 и доливают дистиллированной водой до 100 *мл*; 4) раствор дигитонина (насыщенный); около 1 *г* дигитонина прибавляют к 100 *мл* дистиллированной воды, осадок отфильтровывают.

Для лейкоцитов, дополнительно: 5) ЭДТА-MgK_2 (0,115 *М* раствор, pH 7,4): 54,917 *г* ЭДТА-$MgK_2 \cdot 2H_2O$ растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, 1 н. раствором KOH устанавливают pH равным 7,4 и доливают дистиллированной водой до 100 *мл*; 6) хлорид аммония (0,879%-ный раствор в/о): 8,7 *г* сухого NH_4Cl растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 1000 *мл*; 7) фосфатный буферный раствор, NaCl ($1,33 \cdot 10^{-3}$ *М* фосфат; 0,88% в/о NaCl, pH 7,4): смешивают 28 *мл* раствора 9,078 *г* KH_2PO_4 в 1000 *мл* (водный раствор) и 72 *мл* раствора 11,876 *г* $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ в 1000 *мл* (водный раствор). 20 *мл* этой смеси соединяют с 4,27 *г* ЭДТА-Mg $K_2 \cdot 2H_2O$ и доливают 0,9%-ным раствором NaCl (2) до 1000 *мл*; 8) раствор Тироде, очищенный от кальция: 8,00 *г* NaCl, 0,20 *г* KCl, 0,10 *г* $MgCl_2$, 0,05 *г* $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 1,00 *г* глюкозы, 1,00 *г* $NaHCO_3$ растворяют в дистиллированной воде, объем доводят до 1000 *мл*; для большей устойчивости добавляют несколько капель толуола и сохраняют в темной бутыли.

Для тромбоцитов, дополнительно к реактивам 1 и 4; 9) ЭДТА-Na_2H_2 (1% в/о ЭДТА-$Na_2H_2 \cdot 2H_2O$): 1 *г* ЭДТА-Na_2H_2 растворяют в 100 *мл* физиологического раствора (2).

Для гомогената. 10) физиологический раствор поваренной соли с $6 \cdot 10^{-4}$ *М* ЭДТА: 0,25 *г* ЭДТА-$Na_2H_2 \cdot 2HO_2$ растворяют в физиологическом растворе (2) до 1000 *мл*.

Реактивы для измерения: реактивы (1), (2), (7), а также (11) глюкозо-6-фосфат (около $4 \cdot 10^{-2}$ *М* раствор Г-6-Ф): 130 *мг* Г-6-Ф-Na_2 растворяют в 10 *мл* дистиллированной воды; 12) никотинамидадениндинуклеотидфосфат (около $3 \cdot 10^{-2}$ *М* β-НАДФ): 25 *мг* НАДФ-NaH_2 растворяют в 1,0 *мл* 1%-ного раствора $NaHCO_3$.

Все реактивы сохраняют закупоренными при 0—4° в холодильнике. Растворы НАДФ и глюкозо-6-фосфата могут сохраняться таким образом две-три недели. Замороженными эти растворы сохраняются значительно дольше.

Техника. *Предварительная обработка материала*. Применяют только свежую, непременно свободную от продуктов гемолиза сыворотку (клетки крови богаты Г-6-Ф-ДГ).

Эритроциты. 0,5 *мл* венозной крови берут шприцем, содержащим 0,5 *мл* раствора цитрата (1) и два раза промывают 5 *мл* физио-

логического раствора (2); центрифугируют на лабораторной центрифуге при 1000 g. Осадок суспендируют в 1 *мл* физиологического раствора, опрокидывают и дважды считают эритроциты в камере Тома—Цейсса (около $1 \cdot 10^6/мм^3$).

Гемолиз. Смешивают в центрифужной пробирке: 1,0 *мл* взвеси эритроцитов, 1,0 *мл* дистиллированной воды, 0,7 *мл* буферного раствора триэтаноламина (3) и 0,3 *мл* раствора дигитонина (4) оставляют на 15 мин. в холодильнике при +4°; нерастворимые составные части отцентрифуговывают (15 мин. при 1000 g), осадок выбрасывают.

Изолирование лейкоцитов. В длинной (15 *см*) пробирке смешивают: 45 *мл* венозной крови, 5 *мл* раствора ЭДТА-MgK_2 (5). Для осаждения эритроцитов оставляют стоять в наклонном положении в инкубаторе при +37°. Надосадочную жидкость, содержащую лейкоциты, осторожно отсасывают шариковой пипеткой от слоя эритроцитов и переносят в 10-миллилитровую центрифужную пробирку. Для удаления эритроцитов смешивают 1 объем надосадочной жидкости, содержащей лейкоциты, и 3 объема раствора хлорида аммония (6), оставляют точно на 5 мин. и в течение 3 мин. отцентрифуговывают лейкоциты при низком числе оборотов (100—200 g). Надосадочную жидкость осторожно удаляют и выбрасывают (она содержит гемолизированные эритроциты и тромбоциты). Осадок три раза промывают в буферном растворе фосфата/NaCl (7) и при низком числе оборотов (100 g) центрифугируют на холоду. После последнего промывания осадок суспендируют в 5 *мл* охлажденного на льду раствора Тироде (8). Четырехкратный счет лейкоцитов проводят в камере Тома — Цейсса; число клеток должно быть более 10 000 в 1 $мм^3$.

Цитолиз. Смешивают в центрифужной пробирке: 5 *мл* взвеси лейкоцитов, 2 *мл* дистиллированной воды, 2 *мл* 0,05 *М* буферного раствора триэтаноламина (3), 1 *мл* раствора дигитонина (4) и оставляют на 60 мин. при 0—4° в холодильнике; нерастворимые составные части отцентрифуговывают (15 мин. при 3000 g). Остаток выбрасывают.

Тромбоциты. 18 *мл* венозной крови берут в силиконизированную канюлю или калибровочный силиконизированный шприц с 2 *мл* раствора ЭДТА-MgK_2. Дальше работают только силиконизированными пробирками, пипетками и т. д. Кровь тотчас центрифугируют в предварительно охлажденных пробирках емкостью 8 *мл* в течение 10 мин. при +4° и 100 g. Надосадочную, бедную тромбоцитами плазму декантируют, к осадку добавляют 6 *мл* физиологического раствора (2), осторожно перемешивают деревянной палочкой и центрифугируют при 4° и 1040 g. Из тромбоцитов изготовляют (суспендируют) взвесь в 2 *мл* физиологического раствора (2), проводят двойной подсчет тромбоцитов в фазовоконтрастном микроскопе по способу Фейссли и Людин[1] (около $2 \cdot 10^6$ пластинок на 1 $мм^3$).

---

[1] R. Feissly u. H. Lüdin Kelv. physiol. Acta, 1949, 7, 9.

Цитолиз. В центрифужной пробирке смешивают: 2,0 *мл* взвеси пластинок, 1,0 *мл* дистиллированной воды, 0,7 *мл* буферного раствора триэтаноламина (3), 0,3 *мл* раствора дигитонина (4) и оставляют 60 мин. в холодильнике при 4°; нерастворимые составные части отцентрифуговывают (15 мин. при 1000 *g* и 4°). Осадок выбрасывают.

Ткань печени. Пунктаты печени (по меньшей мере 10 *мг* сырого веса) тотчас после пункции промакают на фильтровальной бумаге для удаления более грубых примесей крови и взвешивают на торзионных весах. Ткань и раствор ЭДТА и поваренной соли (10) в количестве 0,04 *мл/мг* сырого веса помещают в охлажденный льдом стеклянный гомогенизатор и 2 мин. (по секундомеру) гомогенизируют в ледяной бане, затем 20 мин. центрифугируют при 0—1,5° и 15 000 *об/мин*. Прозрачную надосадочную жидкость сливают. Между пункцией печени и началом центрифугирования должно пройти не более 5 мин.

Точность определения активности в ткани печени может быть повышена, если в надосадочной жидкости определяют содержание гемоглобина[1] и на этой основе вычисляют дополнительное значение Г-6-Ф-ДГ, вызванное клетками крови. Это значение следует вычесть из общей активности Г-6-Ф-ДГ.

Постановка опыта. Измерение ведут при 340 или 366 *ммк*, толщина слоя 1 *см*, температура измерения 25° (нагреваемый держатель кюветы); объем анализируемой жидкости 3,0 *мл*. Увеличение экстинкции не должно превышать 0,030 в 1 мин. (измеренное при 366 *ммк*), в противном случае следует применять меньшую или разведенную пробу.

Сыворотка. Последовательно отмеряют пипеткой в кювету: 1,90 *мл* буферного раствора триэтаноламина (3), 1,00 *мл* сыворотки, 0,05 *мл* раствора НАДФ(12) и, смешивая уплощенной внизу стеклянной палочкой, держат 5 мин. при 25°. Добавляют 0,05 *мл* раствора Г-6-Ф (11) и выжидают увеличения экстинкции на 0,020; нажимают секундомер и в течение 10 мин. измеряют экстинкцию каждые 2 мин. Складывают отсчеты увеличений экстинкции за 2 мин., делят среднее значение на 2. Получают *E*/мин., которые входит в вычисление.

Эритроциты. Ввиду высокой экстинкции пробы, обусловленной красящим веществом крови, необходимо поставить контрольный (пустой) опыт. Вместо раствора НАДФ берут буферный раствор (3), в остальном выполняя все так же, как в главном опыте. Измерение ведут против этого контрольного опыта. Последовательно отмеряют пипеткой в кювету: 2,85 *мл* буферного раствора триэтаноламина (3); 0,05 *мл* гемолизата эритроцитов, 0,05 *мл* раствора НАДФ (12). Далее работу ведут, как описано в разделе «Сыворотка».

Лейкоциты. Контрольный (пустой) опыт готовят так же, как описано в разделе «Эритроциты». Измерение ведут против этого

---

[1] В. С. Асатиани. Биохимическая фотометрия. М., Изд-во АН СССР, 1957, 546.

опыта. Последовательно отмеряют пипеткой в кювету: 2,70 *мл* буферного раствора триэтаноламина (3), 0,20 *мл* цитолизата лейкоцитов, 0,05 *мл* раствора НАД (12). Дальше работу ведут, как описано в разделе «Сыворотка».

Тромбоциты. Контрольный (пустой) опыт приготовляют, как описано в разделе «Эритроциты». Измерение ведут против этого опыта. Последовательно отмеряют пипеткой в кювету: 2,40 *мл* буферного раствора триэтаноламина (3), 0,05 *мл* тромболизата, 0,05 *мл* раствора НАДФ (12). Далее работу ведут, как описано в разделе «Сыворотка».

Ткань печени. Последовательно отмеряют пипеткой в кювету: 2,40 *мл* буферного раствора триэтаноламина (3), 0,50 *мл* надосадочной жидкости гомогената печени, 0,5 *мл* раствора НАДФ (12). Далее работу ведут, как описано в разделе «Сыворотка».

Вычисление. По определению, принятому в американской литературе, за единицу принимается количество фермента в 1 *мл* раствора пробы (сыворотка, гомолизат, цитолизат, надосадочная жидкость, гомогенат ткани), которое за 1 мин. при 25° в 3 *мл* изменяет экстинкцию НАДФ-H_2 (НАД-H_2) при 340 *ммк* на 0,001.

Поэтому (при 1 *мл* сыворотки) в 3 *мл* опыта:

$$\frac{\Delta E_{340/\text{мин}}}{0{,}001} = (\Delta E_{340/\text{мин}})\cdot 1000 = \text{ед. Г-6-Ф-ДГ в 1 } \textit{мл} \text{ сыворотки}$$

Эритроциты. При определении активности Г-6-Ф-ДГ в эритроцитах берут 0,05 *мл* гемолизата, который был в три раза разведен при гемолизе. Таким образом, общий фактор разведения составляет $3 \times 20 = 60$. Следовательно, $(\Delta E_{340/\text{мин}})\cdot 60\,000$ = ед. Г-6-Ф-ДГ в 1 *мл* взвеси эритроцитов. Если разделить единицы на каждый миллиметр взвеси, на число эритроцитов в каждом миллилитре и умножить на 10^9, то можно получить активность Г-6-Ф-ДГ в единицах на 10^9 эритроцитов.

Лейкоциты. Фактор разведения: $2 \cdot 5 = 10$.

$$(\Delta E_{340/\text{мин}})\cdot 10\,000 = \text{ед. Г-6-Ф-ДГ в 1 } \textit{мл} \text{ взвеси лейкоцитов.}$$

Перечисление на число клеток см. раздел «Эритроциты».

Тромбоциты. Фактор разведения 4.

$$(\Delta E_{240/\text{мин}})\cdot 4000 = \text{ед. Г-6-Ф-ДГ в 1 } \textit{мл} \text{ взвеси тромбоцитов.}$$

Перечисление на число клеток см. раздел «Эритроциты».

Ткань печени. Активность Г-6-Ф-ДГ в ткани печени относят либо к 1 *мг* растворимого белка (определенного по биуретовому методу) в надосадочной жидкости гомогената, либо на 1 *г* сырого веса. Если измерение ведут при 366 *ммк*, то значения, полученные по произведенным выше уравнениям, умножают на 1,89 (отношение коэффициентов экстинкции НАДФ-Н при 340 и 366 *ммк*).

Перечисление на другие единицы. По Бюхеру [1], единицей являя-

[1] Th. Bücher et al. Z. Naturforsch., 1953, 86, 555.

ется количество фермента, содержащееся в 1 *мл*, которое при 25° и толщине слоя 1 *см* изменяет экстинкцию НАДФ-H_2 (НАД-H_2) при 366 *ммк* в течение 100 сек. на 0,100. Таким образом, по Бюхеру, для 1 ед.:

$$\Delta E_{366} = 0{,}100/100 \text{ сек.}$$

$$\Delta E_{366} = 0{,}060/\text{мин.}$$

$$\Delta E_{340} = 0{,}113/\text{мин.}$$

Для опыта в 3 *мл* $E_{340} = 0{,}0377$/мин.

Таким образом, 1 ед. Бюхера соответствует 37,7 ед. Вроблевского [1] или превращению субстрата в 1,09 *мкмолей* в 1 час в 1 *мл* опыта.

Источники ошибок, вызванных медикаментами. Г-6-Ф-ДГ довольно заметно ингибируется примакином и другими 8-аминохинолин-дериватами (средства против малярии) в миллимолярной концентрации, а также фенилгидразином. Терапевтические концентрации этих веществ, однако, очень невелики и поэтому не имеют существенного влияния на результаты измерения.

Стабильность фермента в пробе. В живом организме время полураспада Г-6-Ф-ДГ в эритроцитах составляет 60 дней. В гемолизатах с буферным раствором триэтаноламина (pH 7,5) половина активности фермента теряется в течение 2 дней; Г-6-Ф-ДГ из эритроцитов в сыворотке имеет время полураспада менее одного дня. Ввиду незначительной стойкости фермента активность Г-6-Ф-ДГ в гемолизатах, сыворотке и плазме должна определяться через несколько часов после изготовления цитолизатов.

Определение церулоплазмина [25]

Принцип. Концентрация церулоплазмина определяется по окислению *п*-фенилендиамина при 37° и pH 6,0. Интенсивность красной окраски продуктов окисления, характеризующихся максимумом поглощения при 520—530 *ммк*, измеряется спектрофотометрически. Для внесения поправки на окисление, вызванное медью и железом, ставится холостой опыт, в котором церулоплазмин ингибируется азидом натрия. За единицу активности принимается повышение поглощения на 0,001 при 530 *ммк* в течение 30 мин. в условиях опыта. Анализ можно проводить и на фотометре. В этом случае в качестве искусственного стандарта используется понтацил фиолетовый 6*R*

Реактивы: 1) ацетатный буфер, 0,1 *М* раствор, pH 6,0: добавляют 10 *мл* 0,1 *М* раствора уксусной кислоты (0,57 *мл* ледяной кис-

---

1 Единица Вроблевского соответствует количеству фермента, которое вызывает изменение экстинкции НАД-H_2 на 0,001 в течение 1 мин. в 3 *мл* раствора при 340 *ммк* и 23°.

лоты+вода до 100 *мл*) к 200 *мл* 0,1 *М* раствора ацетата натрия (1,36 г CH_3COONa на 100 *мл*); pH должен быть 5,95 — 6,00; 2) азид натрия 0,1%-ный раствор в 0,1 *М* ацетатном буферном растворе, pH должен быть 5,95—6,00. Хранить в холодильнике; 3) *п*-фенилендиамин солянокислый 0,25%-ный раствор в 0,1 *М* ацетатном буферном растворе. Перекристаллизовывают продажный препарат следующим образом: растворяют в воде, добавляют древесный уголь, подогревают на водяной бане до 60°, изредка помешивая, и фильтруют. К фильтрату добавляют ацетон до появления мутности, ставят в холодильник на несколько часов, отфильтровывают выпавший солянокислый *п*-фенилендиамин·2HCl и высушивают кристаллы в темноте в вакуумэксикаторе над $CaCl_2$. Хранят в темной бутыли. Для приготовления 0,25%-ного раствора растворяют 12,5 *мг* в 3,0 *мл* ацетатного буферного раствора, используя индикаторную бумагу, pH доводят до 6,0 добавлением 1 н. раствора NaOH каплями из 0,2 *мл* пипетки (требуется около 0,1 *мл*). Добавлением ацетатного буферного раствора объем доводят до 5 *мл*. Этим реактивом можно пользоваться в течение 2 час. после приготовления при хранении в темноте; 4) искусственный стандарт для фотометра: 15,9 *мг* фиолетового понтацила 6*R* на 1 *л* 0,5%-ной уксусной кислоты. Этот стандарт соответствует 400 единицам активности.

Ход определения в спектрофотометре, снабженном термокамерой. Температуру камеры устанавливают на 37°.

1. В 1 *см* кюветы отмеряют следующее:

Холостой опыт: 1 *мл* раствора азида+1,0 *мл* раствора буфера+ +1,0 *мл* раствора *п*-фенилендиамина.

Опыт: 2,0 *мл* раствора буфера+1 *мл* раствора *п*-фенилендиамина.

2. Кюветы ставят в камеру и выжидают 5 мин.

3. В каждую кювету добавляют 0,1 *мл* сыворотки (гепаринизированной или оксалатной плазмы), сильно перемешивая во время добавления.

4. Отсчитывают экстинкцию опыта против холостого опыта при 530 *ммк* точно через 10 мин. ($A_{10\ мин}$) и повторно через 40 мин ($A_{10\ мин}$) после добавления сыворотки.

Вычисление: единицы церулоплазмина ($A_{40\ мин}$ — $A_{10\ мин}$)·1000.

Ход определения в фотометре.

1. В кюветы отмеривают следующее:

Холостой опыт: 2,0 *мл* раствора буфера+2,0 *мл* раствора азида+ +0,2 *мл* сыворотки (гепаринизированной или оксалатной плазмы).

Опыт: 4,0 *мл* раствора буфера +0,2 *мл* сыворотки.

2. Инкубируют опыт, холостой опыт и раствор *п*-фенилендиамина в водяной бане при 37° 5 мин.

3. Добавляют по 2,0 *мл* раствора *п*-фенилендиамина в опыт и холостой опыт и перемешивают. Водяную баню прикрывают темной материей.

4. Отсчитывают опыт против холостого опыта через 10 мин. и повторно через 40 мин. с фильтром № 54.

Вычисление:

$$\text{церулоплазмин (в единицах)} = \frac{\text{отсчет при 40 мин.} - \text{отсчет при 10 мин.}}{\text{отсчет стандарта против воды}} \times 400.$$

Искусственный стандарт. Из изученных красителей для окисления *п*-фенилендиамина церулоплазмином фиолетовый понтацил 6*R* (*D*u Pont) имеет наиболее подходящую кривую поглощения. Для фильтра № 54 фотометра Klett хорошо подобрана концентрация красителя, соответствующая 400 единицам активности. Эту концентрацию красителя можно использовать и для других типов фотометра; для спектрофотометра же при 530 *ммк* она не пригодна.

Влияние света. Окисление *п*-фенилендиамина усиливается под влиянием света. Поэтому опыт нужно проводить в темноте.

Изменения pH. В данной методике оптимальный pH для выявления активности церулоплазмина 6,0. При pH 6,0 и выше, после стадии покоя, скорость реакции нарастает прямолинейно в течение 60 мин. При pH 5,8 и ниже, однако, скорость падает с 30 до 40 мин. Причина этого падения скорости неизвестна. Разными исследователями даны различные значения pH: 5,5, между 6 и 7, между 5,5 и 6,0 и 6,0.

Изменения температуры. В данном методе зависимость log активности против обратной величины абсолютной температуры имеет вид прямой линии в интервале между 22 и 45°. Это дает энергию активности μ 17 000 *кал/мол* и Q_{10} (температурный коэффициент) = 2,45 между 30 и 40°.

Стадия покоя. *п*-фенилендиамин окисляется церулоплазмином и в то же время восстанавливается аскорбиновой кислотой, которая находится в сыворотке до ее полного использования. Стадия покоя никогда не длится дольше 10 мин.

Гемолиз. Минимальный гемолиз не влияет на активность. Авторами не были обнаружены изменения в активности после добавления в сыворотку гемоглобина (200 *мг*/100 *мл*).

Стойкость проб. При комнатной температуре в одних случаях активность сыворотки не падала в течение 2 дней, в других же случаях сыворотка теряла 15% активности за 24 часа. При температуре 4° сыворотка устойчива в течение 2 недель. Ультрафиолетовые лучи (253,7 *ммк*), отщепляя медь, инактивируют оксидазную активность церулоплазмина.

Точность метода +5%.

Норма (для сыворотки человека) от 280 до 570 единиц. Различия в активности церулоплазмина в зависимости от пола не обнаружено, хотя у женщин найдена более высокая активность, так как содержание меди в сыворотке у них выше, чем у мужчин. Новорожденные характеризуются очень низким уровнем церулоплазмина, который приходит к норме в конце первого года жизни. Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

Рэвин пользуется сывороточным холостым опытом, в котором церулоплазмин ингибируется азидом натрия.

Однако в методе Рэвина имеется техническая неточность, которая заключается в том, что сыворотка добавляется к субстрату до

добавления буфера, что вызывает разрушение фермента. Позднее Рэвин [28а] модифицировал свой метод. Модификация была вызвана тем, что азид в незначительных концентрациях полностью ингибирует оксидазную активность, не оказывая влияния на металлический катализ. В других методах окисление, вызванное металлокатализаторами, ингибируется их связыванием ЭДТА, что, однако, спорно, так как иногда наблюдается ингибирование действием ЭДТА оксидазной активности вплоть до 20%. Такое ингибирование может быть вызвано образованием комплекса ЭДТА с медью церулоплазмина (медь легко отделяется от церулоплазмина, что вызывает инактивирование) или же неспецифическим ингибированием фермента поливалентным анионом. Хьюмоллер и другие [28б] показали, что из 8 атомов меди церулоплазмина ЭДТА связывает 4 атома, тем самым вызывая ингибирование оксидазной активности на 50%. Ингибирование носит неконкурирующий характер.

Ими описан также метод капельного анализа, в котором раствор *n*-фенилендиамина в ацетатном буфере анализируют в сухом виде на фильтровальной бумаге.

Бабенко [1] предложил модификацию методики определения активности церулоплазмина.

Принцип метода основан на способности церулоплазмина окислять *n*-фенилендиамин с изменением окраски последнего.

Р е а к т и в ы: 1) 0,5%-ный раствор *n*-фенилендиамина; 2) физиологический раствор (0,2%-ный раствор NaCl в воде); 3) 0,1 н. ацетатный буферный раствор (pH 6,0); 4) 0,5%-ный раствор гидроксиламина солянокислого; 5) 3%-ный раствор хлористого натрия.

Т е х н и к а. Для одного определения берут 3 центрифужные пробирки, которые содержат по 1 *мл* физиологического раствора. В каждую пробирку наливают по 0,2 *мл* крови, взятой микропипеткой из пальца.

Пробирки центрифугируют 10 мин. Потом из пробирки набирают по 0,8 *мл* надосадочного раствора, переносят в 3 другие пробирки, куда прибавляют еще по 1 *мл* раствора *n*-фенилендиамина и 2 *мл* ацетатного буферного раствора.

Две пробирки помещают в термостат при 37° на час, а в контрольную прибавляют 1 *мл* раствора гидроксиламина и 10 *мл* 3%-ного раствора NaCl (растворы которых угнетают действие фермента).

После инкубации в термостат в 2 пробирки также прибавляют аналогичное количество гидроксиламина и NaCl.

Колориметрию исследуемых проб в 2 пробирках проводят при помощи фотоэлектроколориметра против контрольной пробы при зеленом светофильтре (530 *ммк*). Активность церулоплазмина выражают в условных единицах по формуле:

$$A = \frac{10 \cdot E \cdot (1 - 0,002a)}{0,0016a},$$

[1] Персональное сообщение, 1966.

где A — активность фермента, E — показатель шкалы барабана ФЭК, a — содержание сыворотки крови по гематокриту; в норме $a = 55$. Гематокрит — это отношение объема жидкой части крови к форменным элементам, выражается в %. В норме количество церулоплазмина 10—30.

Определение ксантиноксидазы [29]

(КФ 1.2.3.2)

Принцип. Метод основан на фотометрическом определении скорости ферментативного обесцвечивания метиленовой сини.

Реактивы: 1) 0,5 *М* раствор натрий-фосфатного буфера (pH 7,2); 2) 0,5% раствор гипоксантина в 0,05 н. растворе NaOH; 3) 0,0113 *М* раствор метиленовой сини; 4) толуол.

Техника. Навеску ткани (печени) гомогенизируют с 2 объемами воды, добавляя несколько капель толуола. Аликвотную часть полученной взвеси (например, 6 *мл*, что соответствует 2 *г* ткани) отмеряют в целлофановый мешок и диализируют сначала в течение 4 час. против проточной воды, затем против еще большего количества дистиллированной воды (к которой добавляют несколько капель толуола) в течение суток в холодном помещении. По окончании диализа содержимое мешочка (количественно) переносят в мерный цилиндр и разбавляют до определенного объема (обычно 8 *мл*). Для каждого определения готовят по две пробирки Тунберга. В каждую пробирку отмеряют по 2 *мл* диализата (что соответствует 2 *г* свежей ткани) и по 0,2 *мл* 0,5 *М* раствора натрий-фосфатного буфера с pH 7,2. В боковой резервуар отмеряют 0,1 *мл* 0,0113 *М* раствора метиленовой сини и 0,2 *мл* 0,5%-ного раствора гипоксантина в 0,05 н. растворе едкого натра. Боковой резервуар полой пробки тунберговской пробирки служит для приема растворов, которые должны быть смешаны с содержимым главной части пробирки после откачивания воздуха. Пробка пришлифована, причем шлиф ее имеет отверстие, которое, при соответствующем повороте пробки, может быть совмещено с отводной трубкой, через которую ведут отсасывание воздуха, присоединив ее к водоструйному (или масляному) насосу. По окончании отсасывания пробку поворачивают так, чтобы закрыть пробирку. Одновременно ставят холостой опыт, помещая в боковой резервуар 0,2 *мл* воды вместо раствора гипоксантина.

На шлиф пробки в двух местах, одинаково отстоящих от отверстия в шлифе, наносят небольшое количество смазки (безводный ланолин). Пробирку закрывают пробкой, которую прижимают, слегка поворачивая, чтобы притереть шлиф и равномерно распределить по нему смазку, избегая попадания в нее воздуха. Пробку устанавливают так, чтобы отверстие в шлифе приходилось против отводной трубки, которую соединяют с насосом. Воздух отсасывают в течение 3 мин., слегка наклонив пробирку и взбалтывая

ее для ускорения выделения растворенного газа. По окончании отсасывания пробку медленно поворачивают на 180° и, слегка вращая, притирают шлиф.

Обычно для полного удаления кислорода бывает достаточно одного отсасывания в течение 3 мин. (при неполном удалении кислорода он будет действовать на обесцвеченную метиленовую синь, переводя ее в окрашенную форму и, следовательно, мешая определению). Однако авторы рекомендуют в дополнение к отсасыванию проводить еще 5-кратное продувание азотом.

После этого помещают пробирку в водяную баню с постоянной температурой 38° (для выравнивания температуры необходимо поворачивать пробирку, перемешивая ее содержимое и сразу же снова перенося пробирку в баню). Через 2 мин. с момента смешивания растворов в пробирке определяют (визуально или фотометрически) скорость обесцвечивания метиленовой сини. В холодном опыте продолжительность обесцвечивания составляет обычно 20—30 мин.

Как и другие варианты тунберговского метода, спектрофотометрический метод Калькара [30], описанный выше, предназначен главным образом для анализа тканей, обладающих высокой ксантиноксидазной активностью. В этом отношении заслуживает проверки предложенный Дитрихом и Боррис [31] метод, обладающий тем преимуществом, что он позволяет обходиться без длительной инкубации. Кроме того, авторы указывают на значительно бо́льшую чувствительность этого метода. Анализ ведут с гомогенатами ткани, в пробах которых фотометрически определяют количество образующейся мочевой кислоты и аллантоина.

Позднее Ричерт [32] радикально изменил свой метод, значительно упростив его в одном отношении, но несколько усложнив в другом. Упрощение заключается в том, что определение сводится к простому измерению на фотоэлектрическом колориметре; усложнение — в необходимости применения вместо легкодоступной метиленовой сини другой краски — натриевой соли 2,6-дихлорбензофенониндо-3-хлорфенола. Определение ведут следующим образом. В кювету фотоэлектрического колориметра отмеряют 2,7 *мл* *M*/15 фосфатного буферного раствора с рН 6,3 (вернее, несколько меньший объем, учитывая объем раствора фермента, который должен быть добавлен в дальнейшем), 2 *мл* разведенного (1 : 10) фильтрата раствора краски (полученного одночасовым встряхиванием 35 *мг* краски в 80 *мл* воды, последующим фильтрованием и доведением фильтрата водой до 100 *мл*) и 1 *мл* 0,05 *M* раствора гипоксантина в 0,05 *M* растворе едкого натра. Затем в ту же кювету отмеряют от 0,01 до 0,2 *мл* исследуемого раствора фермента (который сохраняют на холоду), быстро встряхивают и исследуют на фотоэлектрическом колориметре при длине волны 600 *ммк*. По секундомеру отсчитывают время, затрачиваемое на снижение отсчета в колориметре от 100 до 60, что служит мерой активности фермента.

Определение глутатионредуктазы [33]
(КФ 1.6.4.2)

Принцип. Глутатионредуктаза (ГР) катализирует реакции:

$$GSSG + НАДФ\text{-}H + H^+ \rightarrow 2GSH + НАДФ^+, \quad (1)$$

$$GSSG + НАД\text{-}H + H^+ \rightarrow 2GSH + НАД^+. \quad (2)$$

Реакция идет полностью: она необратима. Измеряют временное уменьшение экстинкций НАДФ-H_2 (НАД-H_2).

Определение глутатионредуктазы, специфичной к НАДФ-H_2
(см. глутатионредуктаза)

Оптимальные условия измерения. В сыворотке крови человека оптимум рН для фермента в фосфатном и трис/ /малеинатном буферах лежит между 6,4 и 6,7. При рН 6,5 фермент с 10^{-3} *М* GSSG и $4 \cdot 10^{-4}$ *М* НАДФ-H_2 насыщен. Константа Михаэлиса при насыщении фермента окисленным глутатионом $K_{НАДФ\text{-}H_2} = 2{,}5 \cdot 10^{-5}$ *М*, при насыщении НАДФ $K_{GSSG} = 7 \cdot 10^{-3}$ *М*. Концентрации окисленного глутатиона больше $5 \cdot 10^{-3}$ *М* тормозят реакцию. Реакция протекает временно линейно до $\Delta E_{366} = 0{,}1$.

Реактивы: 1) фосфатный буфер (0,067 *М* раствор, рН 6,6): а) 9,087 *г* однозамещенного фосфата калия растворяют в бидистиллированной воде и доводят объем до 1000 *мл*; б) 11,876 *г* двузамещенного фосфата натрия ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) растворяют в бидистиллированной воде и доводят объем до 1000 *мл*. 360 *мл* раствора *б* дополняют раствором *а* до 1000 *мл*; 2) восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат (приблизительно $6 \cdot 10^{-3}$ *М* β-НАДФ-Н): 6 *мг* натриевой соли НАДФ растворяют в 1%-ном растворе двууглекислой соды, объем доводят до 10,0 *мл*; 3) окисленный глутатион (7,5 10^{-3} *М* GSSG): 230 *мг* GSSG растворяют приблизительно в 20 *мл* бидистиллированной воды, значение рН доводят до 6,61 н. раствором едкого натра, дополняют объем бидистиллированной водой до 5 *мл* (GSSG — окисленный, GSH — восстановленный глутатион).

Стойкость реактивов. Замороженный раствор окисленного глутатиона сохраняется минимум 4 недели. Замороженный раствор НАД-Н через неделю теряет действие. В сыворотке глутатионредуктаза не теряет активности в течение 5—6 дней, если ее хранят, сильно замораживая.

Техника. *Постановка опыта*. Используют по возможности свежую и не гемолизированную сыворотку. Измерение ведут при 340 или 366 *ммк*, толщина слоя 1 *см*, измеряемый объем 3 *мл*; температура 25° (постоянно). К каждой смеси ставят пустой опыт с водой вместо GSSG. Измеряют против воды или воздуха.

В кювету последовательно отмеряют пипеткой: 2,4 *мл* раствора фосфатного буфера (1), 0,2 *мл* раствора GSSG (3), 0,2 *мл* раствора НАДФ-H_2 (2), 0,2 *мл* сыворотки, смешивают и отсчитывают экстинкцию E_0. Точно через 1, 2 и 3 мин. отсчитывают экстинкции E_1, E_2 и E_3. С пустым опытом проводят те же операции. Выводят средние значения ΔE/мин.

Восстановление глутатиона, которое зависит от НАДФ-H_2 при данных условиях протекает линейно во времени. При очень большой активности или нелинейном ходе реакции сыворотку разбавляют.

Вычисление. Единица активности глутатионредуктазы — это количество фермента, которое при 25° за 1 час восстанавливает 1 *мкмоль* окисленного глутатиона. Для вычисления берут разницу между средними значениями пробы и пустого опыта: $\Delta E_{\text{ср/мин}}$. Если взято 0,2 *мл* сыворотки в 3 *мл* опытной смеси — для измерения при 340 *ммк*, то

$$\frac{(\Delta E_{\text{ср}}/\text{мин.})\cdot 3\cdot 60}{6{,}22\cdot 0{,}2} = (\Delta E_{\text{ср}}/\text{мин.})\cdot 144 = \text{единицам в 1 мл сыворотки},$$

для измерения при 366 *ммк*:

$$\frac{(\Delta E_{\text{ср}}/\text{мин})\cdot 3\cdot 60}{3{,}3\cdot 0{,}2} = (\Delta E_{\text{ср}}/\text{мин.})\cdot 272 = \text{единицам в 1 мл сыворотки},$$

где 6,22 и 3,3 [*см²/мкмоль*] — коэффициенты экстинкции НАДФ-H_2 при 340 и 366 *ммк*, 3 — объем опытной смеси, 60-пересчет минут на часы, 0,2 — *мл* сыворотки в опытной смеси.

Метод можно использовать и для анализа растительного материала и в микроорганизмах.

Определение глутатионредуктазы, специфичной к НАД-H_2 [34] *(см. глутатионредуктаза: КФ 1.6.4.2)*

Фермент может не быть насыщенным НАД-H_2, потому что для этого требуется приблизительно в 20 раз больше НАД-H_2, чем это можно осуществить в этом методе. Поэтому условия измерения неоптимальны.

Реактивы: 1) фосфатный буферный раствор (0,067 *М*, pH 6,2): а) 9,087 *г* однозамещенного фосфата калия растворяют в бидистиллированной воде и объем доводят до 1000 *мл*; б) 11,876 *г* двузамещенного фосфата натрия ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) растворяют в бидистиллированной воде и объем доводят до 1000 *мл*. 185 *мл* раствора *б* наполняют до 1000 *мл* раствором *а*; 2) восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (приблизительно $1{,}2\cdot10^{-2}$ *М* раствор β-НАД-H_2): 100 *мг* натриевой соли НАД-H_2 растворяют в 1%-ном растворе двууглекислой соды; 3) окисленный глутатион ($7{,}5\cdot10^{-3}$*М* GSSG): 230 *мг* GSSG растворяют приблизительно в 20 *мл* бидистиллированной воды, значение pH доводят до 6,5 1 н. раствором едкого натра и бидистиллированной водой дополняют до 50 *мл*.

Стойкость реактивов. Замороженный раствор НАД-H_2 можно хранить больше недели без потери активности. Замороженный раствор окисленного глутатиона сохраняется минимум 4 недели.

Техника. *Постановка опыта.* Используют, по возможности, свежую и только негемолизированную сыворотку. Измерение ведут при 340 или 366 *ммк*, толщина слоя 1 *см*, измеряемый объем 3 *мл*, температура 25°. К каждой смеси ставят пустой опыт с водой. Измеряют против воды или воздуха.

В кювету последовательно отмеряют пипеткой: 2,2 *мл* фосфатного буферного раствора (1), 0,1 *мл* раствора НАД-H_2 (2), 0,2 *мл* раствора GSSG (3), 0,5 *мл* сыворотки, смешивают и отсчитывают экстинкцию E_0. Содержимое кюветы наливают в пробирку и инкубируют при 25° в водяной бане; затем обратно возвращают в кювету с таким расчетом времени, чтобы точно через 20 мин. отсчитать экстинкцию E_{20} (из-за низкой активности глутатионредуктазы, специфичной к НАД-H_2, в сыворотке достаточен второй отсчет через 20 мин.). Также проводят определение с пустым опытом. $E_0 - E_{20}$ для пробы и пустого опыта входят в вычисление. До 0,1 разницы экстинкции реакция протекает временно линейно. При очень высокой активности в сыворотке экстинкцию отсчитывают в короткие интервалы, например каждые 5 или 10 мин.

Вычисление [1]. Для измерения при 340 *ммк* при 0,5 *мл* сыворотки в 3 *мл* опытной смеси:

$$\frac{(\Delta E_{ср}/20\ мин.)\cdot 3{,}60}{6{,}22\cdot 0{,}5\cdot 20} = (\Delta E_{ср}/20\ мин)\cdot 2{,}9 = ед/мл\ \text{сыворотки.}$$

Для измерения при 366 *ммк*:

$$\frac{(\Delta E_{ср}/20\ мин.)\cdot 3{,}60}{3{,}3\cdot 0{,}5\cdot 20} = (\Delta E_{ср}/20\ мин.)\cdot 5{,}4 = ед/мл\ \text{сыворотки.}$$

Если измеряемое время меньше 20 мин., то это надо принять во внимание во время вычисления.

Значения активности ГР в сыворотке человека. В 10 нормальных сыворотках нашли в среднем 0,77 *ед/мл* ГР, специфичной к НАДФ-H_2, и 0,42 *ед/мл* для ГР, специфичной к НАД-H_2. Соответственные значения активности для сыворотки при неизлечимых злокачественных опухолях: 9,17 и 4,7; метастазах печени (рака желудка): 2,34 и 1,32; острые приступы порфирии: 6,53 и 3,05. Во всех случаях соотношение активности обоих ферментов равно приблизительно 1,9 : 1,0.

Влияние терапевтически важных соединений. Для действия глутатионредуктазы необходимы функциональные SH-группы. Поэтому фермент совсем ингибируется салиграном, но его можно снова привести в действие избыточным количеством цистеина. Еще ингибируют его двухвалентные катионы: цинк при концентрации 10^{-6} *М* уже тормозит его больше чем на 50%. Инсулин с высоким содержанием цинка тормозит очень сильно. Преинкубация фермента с НАДФ-H_2 и GSSG может защитить его от ингибирующего действия цинка или

---

[1] См. стр. 608.

инсулина. Реактивирование торможения тяжелыми металлами невозможно при помощи ЭДТА. Гепарин ингибирует (зависит от pH) особенно реакцию с НАД-H_2: при оптимуме реакции (pH 6,2) фермент почти полностью тормозится $2 \cdot 10^{-6}$ *M* гепарина. При определенных патологических условиях фермент сыворотки ингибируется до полной потери активности. Причины этого неизвестны.

Метод можно использовать и для анализа растительного материала и в микроорганизмах.

Определение цитохром-*c*-оксидазы [35]

(цитохромоксидаза: КФ 1.9.3.1)

Принцип. При контакте митохондрий с диметилпарафенилендиамингидрохлоридом (ДПФД) из последнего образуется красный пигмент в количестве, пропорциональном активности цитохром-*c*-оксидазы и времени инкубации от 1 до 3 мин. Прямая пропорциональность сохраняется при количестве добавляемых митохондрий, содержащем от 1 до 30 *мкг* общего азота. Специфическим субстратом служил добавляемый цитохром *c*, донатором электронов — ДПФД.

Реактивы: 1) боратный буфер pH 8,5 (0,05 *M* раствор $Na_2B_4O_7$, 0,1н. раствор HCl) (приготовление см. Rauen H. Biochemisches Taschenbuch. Berlin. 1964, Teil 2.S93); 2) 0,4%-ный раствор диметилпарафенилендиамингидрохлорида, pH 4,0 (может сохраняться на льду несколько часов); 3) 0,04%-ный раствор цитохрома *c*; 4) этиловый спирт; 5) стандартный раствор митохондрий.

Техника. В пробирку размером 100 × 15 *мм* (должны быть подобраны по размеру) наливают 0,4 *мл* раствора боратного буфера, 0,4 *мл* 0,04%-ного раствора цитохрома *c* и 1 *мл* стандартизованной взвеси митохондрий. Прибавляют 0,2 *мл* 0,4%-ного раствора ДПФД (pH реакционной смеси 6,8—7,2) и инкубируют 3 мин. при 37°. Содержимое пробирки становится ярко-розовым. Быстро прибавляют 1 *мл* спирта для инактивации фермента, энергично встряхивают и охлаждают на льду 1 мин., после чего колориметрируют при 536 *ммк* (ФЭКН-57, фильтр 5, кювета 3 *мм*). Одновременно обрабатываются две параллельные пробы и один контроль. Последний содержит те же ингредиенты, что и опыт, но спирт добавляется до прогревания. Добавлять раствор ДПФД и спирт в разные пробирки одной пробы нужно одними и теми же пипетками (разумеется, разными для каждого реактива) с интервалами не более 5—10 сек. Удельная активность фермента рассчитывается путем деления полученной средней экстинкции, умноженной на 100, на количество микрограммов общего азота митохондрий в пробе и время инкубации в минутах.

При соблюдении всех условий опыта точность может быть доведена до 3—5%.

Метод можно использовать и для анализа растительного материала и микроорганизмов.

Определение каталазы [36]
(КФ 1.11.1.6)

Принцип. Две молекулы H_2O_2 разлагаются каталазой крови на $2H_2O$ и O_2. Избыток перекиси титруют перманганатом в кислой среде.

В опыте определяют количество оставшейся неразрушенной перекиси водорода, в контроле — общее количество взятой перекиси в присутствии каталазы, инактивированной кипячением. Вычитая результаты опыта из результатов контроля, узнают количество разрушенной за определенное время (30 мин.) перекиси, что дает возможность судить об активности каталазы.

Определив количество каталазы (каталазное число), относят его к числу эритроцитов, т. е. составляют дробь, числителем которой служит найденное количество каталазы, а знаменателем — число красных кровяных клеток в миллионах в 1 *мм*³ (в капле крови, взятой каждый раз одновременно тут же, при совершенно одинаковых условиях). Эту дробь называют показателем каталазы, и только эти показатели каталазы, а не каталазные числа можно сравнивать между собой.

Реактивы: 1) 1%-ный раствор пергидроля; так как продажный пергидроль имеет концентрацию 30%, то его разбавляют в 30 раз, т. е. к 1 *мл* пергидроля прибавляют 29 *мл* воды; 2) 0,1 н. раствор марганцовокислого калия; 3) 10%-ный раствор серной кислоты.

Техника. В небольшую колбочку отмеривают точно 20 *мл* дистиллированной воды. Кровь берут путем укола в палец, не обмывая ни спиртом, ни эфиром, которые изменяют просвет капилляров, а только стерильной дистиллированной водой, и обсушивают ватой, избегая трения; так как для исследования требуется 0,02 *мл* крови, то пользуются пипеткой, приложенной к гемометру типа Сали. Кровь выдувают в воду, обычным образом ополаскивая пипетку, при этом получается раствор крови 1 : 1000 (основной раствор).

Момент разведения крови отмечают на часах. Заготовляют четыре колбочки, отмеряя в каждую 7 *мл* дистиллированной воды. В две первые переносят по 1 *мл* основного раствора крови (для параллельного определения), в две вторые — по 1 *мл* предварительно прокипяченной в течение 2 мин. крови. Все четыре колбочки оставляют на 30 мин. при комнатной температуре. Небольшие колебания температуры, в пределах 2—3°, не имеют значения. Через указанный срок (считая с момента первого разведения крови) в каждую колбочку приливают точно по 2 *мл* 1%-ного раствора пергидроля, опять оставляют их на 30 мин., затем быстро приливают по 5 *мл* 10%-ного раствора серной кислоты для прекращения действия фермента и титруют 0,1 н. раствором марганцовокислого калия до появления стойкого розового окрашивания. Каталаза разлагает часть пергидроля, поэтому при титровании первых двух колб приходится потратить меньшее количество титрованного раствора, чем

для двух последних; этой разностью пользуются для дальнейшего вычисления.

Расчет. Так как 1 *мл* 0,1н. раствора марганцовокислого калия соответствует 1,7 *мл* 1%-ного раствора пергидроля, то полученную разность умножают на 1,7 и получают каталазное число, из которого уже вычисляют показатель каталазы. Точность метода 3—5%.

Метод можно использовать и для анализа растительного материала и в микроорганизмах.

Определение пероксидазы [37]

(КФ 1. 11. 1.7)

Принцип. Метод основан на определении скорости реакции окисления индигокармина перекисью водорода в слабокислой среде в присутствии пероксидазы крови. Мерой активности пероксидазы является время, необходимое для окисления индигокармина.

Реактивы: 1) раствор индигокармина: 10 *мл* 0,001н. раствора индигокармина подкисляют 5 *мл* 2 н. раствора серной кислоты и титруют свежеприготовленным 0,001 н. раствором перманганата до перехода синей окраски через зеленую в чисто желтую. Раствор индигокармина постепенно уменьшает свой титр при хранении, поэтому готовят 0,01 н. раствор, который каждые 2—3 дня берут для разведения до требуемой концентрации (0,001 н.), предварительно профильтровав его. Титр рабочего 0,001 н. раствора индигокармина проверяют каждые 2—3 дня; 2) 0,2 н. раствор перекиси водорода; 3) ацетатный буферный раствор с pH 4,7: готовят смешиванием равных объемов 0,2 н. раствора уксусной кислоты и 0,2 н. раствора уксуснокислого натрия.

Техника. В пробирку светлого стекла к 2 *мл* ацетатного буферного раствора (pH 4,7) прибавляют 3 *мл* крови, разведенной 1 : 1000 (0,02 *мл* крови в 20 *мл* воды). Добавляют 2 *мл* воды, смешивают и прибавляют 1 *мл* 0,001н. раствора индигокармина. После этого в ту же пробирку отмеривают 2 *мл* 0,2 н. раствора перекиси водорода и смешивают. Момент внесения перекиси водорода есть начало реакции, которое отмечают секундомером. Как только синий раствор перейдет через зеленый в желто-розовый, реакцию окисления считают законченной (отсчет по секундомеру). Изменение окраски можно наблюдать в проходящем и отраженном свете на белом фоне.

Расчет. Пероксидазную активность крови выражают в секундах, потребных для обесцвечивания индигокармина. В норме для обесцвечивания необходимо 30—50 сек. Точность метода порядка 5%.

Определение альдолазы [38]

(КФ 4.1.2.7)

Принцип. Альдолаза расщепляет фруктозо-1,6-дифосфат, продукты распада которого (фосфотриозы) образуют с 2,4-динитрофенилгидразином в щелочной среде окрашенное в лиловый цвет соединение. Фруктозо-1,6-дифосфат инкубируют в буферном растворе с исследуемой пробой и гидразинсульфатом для связывания освобождающихся фосфотриоз. Белки осаждают, и в трихлоруксусном фильтрате определяют фотометрически окрашенное производное фосфотриоз. Интенсивность окраски пропорциональна активности альдолазы.

Реактивы: 1) фруктозодифосфат в виде натриевой соли. 270 *мг* бариевой соли фруктозодифосфата растворяют в 3,5 *мл* 1 н. раствора соляной кислоты (8,5 *мл* соляной кислоты удельного веса 1,19 в 100 *мл* воды) и добавляют 1 *мл* 1 *М* раствора (14%) сернокислого натрия. Надосадочную жидкость проверяют на полноту осаждения ионов бария прибавлением одной капли раствора сернокислого натрия. При полном осаждении бария надосадочную жидкость сливают в мерную колбу емкостью 25 *мл*, подщелачивают 3%-ным раствором едкого натра до pH 7,4 и доводят дистиллированной водой до метки. Получают приблизительно 0,002 *М* раствор натриевой соли фруктозодифосфата. Этот раствор может храниться в холодильнике не дольше двух недель; 2) 2,4-динитрофенилгидразин. Растворяют 0,1 *г* соли в 100 *мл* 2 н. раствора соляной кислоты (17 *мл* соляной кислоты удельного веса 1,19 в 100 *мл* воды); 3) 0,1 *М* раствор коллидина (2,4,6-триметилпиридин) с pH 7,4: растворяют 1,3 *мл* коллидина в 100 *мл* воды и, если нужно, подкисляют соляной кислотой до pH 7,4. Вместо коллидина можно пользоваться 1%-ным раствором пиридина или 0,5%-ным раствором двууглекислой соды; 4) 0,56 *М* раствор гидразинсульфата. Растворяют 7,3 *г* соли в небольшом количестве воды при подщелачивании едким натром до pH 7,4 и доводят водой до 100 *мл*; 5) 0,002 *М* раствор монойодуксусной кислоты. Растворяют 0,04 *г* кислоты в 100 *мл* воды и доводят раствором едкого натра pH до 7,4; 6) 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты; 7) 3%-ный раствор едкого натра; 8) 0,04%-ный раствор бромтимолового синего (индикатор). Растворяют 0,01 *г* индикатора в 3, 2 *мл* 0,2%-ного раствора едкого натра и доводят водой до 25 *мл*. Этим раствором индикатора пользуются при подщелачивании всех растворов до pH 7,4—7,6 (синий цвет).

Растворы коллидинового буфера или двууглекислой соды, гидразина и йодуксусной кислоты лучше хранить в смеси при следующем соотношении: 1 часть раствора соды, 0,25 части раствора гидразина, 0,25 части раствора йодуксусной кислоты и 0,25 части дистиллированной воды. К этой смеси прибавляют 0,25 части раствора фруктозодифосфата. Например, на 10 проб берут 1,75 *мл* смеси и 0,52 *мл* фруктозодифосфата, добавляемого ex tempore. Для

более полного использования фруктозодифосфата рекомендуется заранее стерильно приготовлять рабочий раствор и хранить его в ампулах по 0,25—0,5 *мл* (на 10—20 проб крови).

Техника. В центрифужную пробирку вносят 0,1 *мл* испытуемой сыворотки и добавляют 0,2 *мл* смеси реактивов, перемешивают и инкубируют в течение часа при 37—38°. Белки осаждают прибавлением 0,3 *мл* 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Центрифугируют 10 мин. при 1200—1500 *об/мин*.

В ту же пробирку добавляют 0,6 *мл* 3%-ного раствора едкого натра, оставляют ее на 10 мин. при комнатной температуре, а затем добавляют в нее 0,6 *мл* раствора 2,4-динитрофенилгидразина. Нагревают на водяной бане в течение 10 мин. при 38°. Добавляют 4,2 *мл* 3%-ного раствора едкого натра. Образовавшуюся окраску колориметрируют в фотоэлектроколориметре в кювете с рабочей длиной 0,5 *см* (с зеленым светофильтром 530—540 *ммк*) не позднее чем через 10—20 мин., так как при более длительном стоянии окраска бледнеет.

Для контроля берут 0,1 *мл* испытуемой сыворотки, добавляют 0,18 *мл* смеси без раствора фруктозодифосфата. После часовой инкубации добавляют 0,02 *мл* раствора фруктозодифосфата, непосредственно перед удалением белков, и определение проводят так же, как описано выше.

Расчет. Активность альдолазы сыворотки крови выражают в условных единицах экстинкции, умноженных на 100 ($E \times 100$), для чего показания гальванометра переводят в показатели экстинкции. При более грубом определении альдолазы вместо фотоэлектроколориметра можно пользоваться цветной шкалой растворов.

При соблюдении всех условий опыта точность может быть доведена до 3—5%.

Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

Определение 1-фосфофруктальдолазы [39]

Принцип. Фермент 1-фосфофруктальдолаза (ФФА) катализирует реакцию:

$$\text{Фруктозо-1-фосфат} \rightleftarrows \text{диоксиацетонфосфат} + D\text{-глицериновый альдегид.} \quad (1)$$

Равновесие смещено в левую сторону. Дальнейшее превращение диоксиацетонфосфата посредством индикаторной реакции дает, однако, количественное превращение фруктозо-1-фосфата:

$$\text{диоксиацетонфосфат} + \text{НАД}\cdot H_2 \rightleftarrows \alpha\text{-глицерофосфат} + \text{НАД.} \quad (2)$$

Расходование НАД·H_2 идет пропорционально количеству диоксиацетонфосфата, образующегося после реакции (1), а вместе с этим и активности фермента.

Реактивы (готовятся на воде, дистиллированной в кварцевой посуде): 1) буферный раствор триэтаноламина (0,05 *М*, pH 7,6): 9,3 *г* триэтаноламингидрохлорида растворяют в 22 *мл* 1 н. раствора едкого натра и доводят дистиллированной водой до 1000 *мл*; 2) фруктозо-1-фосфат (около 0,2 *М* раствора Ф-1-Ф): 0,9 *г* барий-фруктозо-1-фосфата растворяют в 8 *мл* дистиллированной воды и смешивают с количеством насыщенного раствора сульфата натрия, достаточным для полного осаждения бария. Отцентрифуговывают осадок сульфата бария и дополняют прозрачный раствор соли натрия дистиллированной водой до 10 *мл*; или растворяют 0,9 *г* соли дициклогексиламмония в дистиллированной воде, доводя объем до 10 *мл*; 3) восстановленный дифосфопиридиннуклеотид (около $1{,}5 \cdot 10^{-2}$*М* β-НАД-H_2): 100 *мг* НАД-H_2 растворяют в дистиллированной воде и доводят до pH 7,6 1%-ным раствором бикарбоната натрия; 4) α-глицерофосфатдегидрогеназа (ГФДГ) (2 *мг* белка в 1 *мл*); имеющуюся в продаже кристаллическую суспензию соответственно разбавляют 2 *М* раствором сульфата аммония.

Все реактивы сохраняются в закупоренном виде в холодильнике при температуре от 0 до +4°. Суспензия ГФДГ не должна замораживаться.

Раствор НАД-H_2 возобновляют еженедельно, раствор фруктозо-1-фосфата сохраняется более продолжительное время, если исключить рост микроорганизмов пропариванием колбы и стерильным взятием раствора.

Техника. Последовательно отмеряют в кювету пипеткой 1,8 *мл* сыворотки и 0,05 *мл* раствора НАД-H_2 (3). Оставляют стоять 15 мин. За это время успевают прореагировать присущие сыворотке субстраты (особенно, пируват). Реакцию начинают с добавления 0,02 *мл* суспензии ГФДГ (4) и 0,2 *мл* раствора фруктозо-1-фосфата (2). Хорошо смешивают. Измерение ведут при 336 *ммк*, толщина слоя 1 *см*, объем анализируемой жидкости 2,07 *мл*, температура постоянная—25°. Измерение—против воздуха или дистиллированной воды. Приблизительно через 3—4 мин. после начала реакции засекают время, которое требуется для хорошо отсчитываемого изменения экстинкции. Если прежде уже перевели стрелку непосредственно регистрирующего фотометра в благоприятную область измерения, то достаточными будут изменения экстинкции от 0,020 до 0,050.

Вычисление. Единицей, по Вольфу, является то количество фермента, которое понижает в опыте объемом 2,07 *мл* экстинкцию НАД-H_2 при 366 *ммк* на 0,100 в течение 100 мин. (25°). Отсчитываемое изменение экстинкции, таким образом, следует умножить на 1000. Содержание фермента в единицах на 1 *мл* сыворотки получают после деления полученной величины на число миллилитров сыворотки, взятых для опыта.

Так как реакция ФФА протекает $\Delta E \approx 0{,}200$ линейно во времени, нет необходимости измерять время для $\Delta E = 0{,}100$. Вычисляют единицы активности из более быстро измеряемых малых

значений ΔE, согласно

$$\frac{\Delta E_{366}\cdot 1000}{мл\ сыворотки\cdot время\ (мин.)} = ед.\ ФФА\ в\ 1\ мл\ сыворотки.$$

Если сыворотка сильно желтушная, то для понижения абсорбции света ее разводят буферным раствором триэтаноламина (1) до тех пор, пока $\log I_0/I$ (где I_0 — интенсивность входящего света, I — интенсивность выходящего света) не будет меньше 1,0, включая экстинкцию НАД-H_2. Это разведение учитывают при вычислении.

Пример. Количество сыворотки 1,8 *мл*. Изменение экстинкции за 10 мин. $\Delta E = 0{,}040$:

$$\frac{0{,}040\cdot 1000}{1{,}8\cdot 10} = 2{,}2\ ед.\ ФФА\ в\ 1\ мл\ сыворотки$$

или изменение экстинкции за 20 мин. $\Delta E = 0{,}080$:

$$\frac{0{,}080\cdot 1000}{1{,}8\cdot 20} = 2{,}2\ ед.\ ФФА\ в\ 1\ мл\ сыворотки.$$

Метод можно использовать и для анализа растительного материала.

Определение орнитинкарбамилтрансферазы [40]

(КФ 2.1.3.3)

Принцип. Орнитинкарбамилтрансфераза (орнитинтранскарбамилаза) — это фермент, катализирующий первый этап цикла мочевины (орнитина):

$$орнитин + карбамилфосфат \underset{трансфераза}{\overset{орнитинкарбамил}{\rightleftarrows}} цитруллин + фосфат$$

Метод основан на том, что фермент катализирует и арсенолиз цитруллина до орнитина, углекислоты и аммиака.

$$цитруллин \xrightarrow[арсенат]{орнитинкарбамилтрансфераза} орнитин + CO_2 + NH_3.$$

Реактивы: 1) мышьяковистый буфер: 0,5 *М* раствор арсената натрия (15,6 *г* $Na_2HAsO_4\cdot 7H_2O$ в 100 *мл* воды) титруют 12 н. HCl до pH 7,15; 2) буферированный субстратный раствор: 350 *мг* *DL*-цитруллина растворяют в 10 *мл* раствора мышьяковистого буфера; раствор стоек несколько дней в холодильнике при 4°; 3) 4*М* раствор хлорной кислоты (уд. вес 1,67); 4) насыщенный раствор карбоната: 125 *г* K_2CO_3 и 30 *г* $KHCO_3$ в 100 *мл* воды кипятят 10 мин. для удаления содержащегося аммиака; 5) 0,01 н. раствор серной кислоты; 6) разведенный реактив Несслера. В начале работы разводят 0,2 *мл* реактива Несслера с 1,3 *мл* воды. Неразведенный реактив Несслера изготовляют путем растворения 45,5 *г* HgJ_2 и 34,9 *г* KJ в возможно меньшем количестве воды, после чего прибавляют

112 *г* КОН, растворенного в 140 *мл* воды, и дополняют до 1 *л*. По истечении трех дней раствор годен к употреблению.

Т е х н и к а. В пробирке смешивают 1 *мл* исследуемой сыворотки с 1 *мл* буферированного субстратного раствора. После инкубирования в течение 24 час. при 37° прибавляют 0,2 *мл* хлорной кислоты и центрифугируют. Во внутреннюю камеру чашки Конвея наливают 1,5 *мл* 0,01н. раствора серной кислоты, во внешнюю 1,1 *мл* прозрачного центрифугата (0,5 *мл* сыворотки) и с другого края камеры помещают 2 *мл* карбонатного раствора, осторожно, чтобы не смешать его с центрифугатом. Плотно закрыв чашку, осторожными движениями размешивают центрифугат с карбонатным раствором во внешней камере чашки и ставят ее в термостат при 37° на 1 час. По окончании диффузии из внутренней камеры высасывают возможно большее количество жидкости (около 1,3 *мл*) и наливают в кювету фотометра Пульфриха, смешивают с равным объемом разведенного раствора Несслера и фотометрируют не позже 30 мин. при 400 *ммк* против компенсационной жидкости — проба, состоящая из 1 *мл* сыворотки и 1 *мл* мышьяковистого буфера, обработанных тем же способом.

Вычисляют по калибровочной кривой, полученной при помощи нейтрального сернокислого аммония (1,46 *г* до 1 *л* воды) в *мкг*, аммиачного азота, содержащегося в пробе (0,5 *мл* сыворотки). 1 *мл* вышеуказанного стандартного раствора содержит 300 *мкг* аммиачного азота. Число *мкг* аммиачного азота, освобожденного при условиях опыта, дает нам единицы фермента, т. е. одна единица фермента равна одному микрограмму (*мкг*) аммиачного азота, выделенного из 0,5 *мл* сыворотки при 37° за 24 часа.

При соблюдении всех условий опыта точность может быть доведена до 3—5%.

Определение транскетолазы (ТК) [41]

(КФ 2.2.1.1)

П р и н ц и п. Р-5-Ф (рибозо-5-фосфат-субстрат) с сывороткой крови (фермент) инкубируют в буферном растворе, при этом образуется С-7-Ф. К концу инкубации реакцию останавливают трихлоруксусной кислотой. К центрифугату, содержащему С-7-Ф, прибавляют концентрированную H_2SO_4 и цистеин-гидрохлорид. В результате реакции между С-7-Ф и концентрированной H_2SO_4 образуется оксиэтилфурфурол, который, взаимодействуя с цистеингидрохлоридом, образует соединение, окрашенное в ярко-розовый цвет.

Оптическая плотность раствора пропорциональна концентрации седогептулозы, а следовательно, и активности ТК.

При определении концентрации седогептулозы используется метод Дише [1].

---

[1] Z. D i s h e. J. Biol. Chem., 1953, 204, 983.

Р е а к т и в ы: 1) 0,056 *М* раствор трис-буфера (гидрооксиметиламинометан, молекулярный вес 121,1) с pH 7,5: 340 *мг* трис-буфера растворяют в 40 *мл* дистиллированной воды и доводят 1н. раствором HCl до pH 7,5. Затем доливают дистиллированной водой до 50 *мл*; 2) субстрат. 0,01 *М* раствор калиевой соли Р-5-Ф готовят из бариевой соли Р-5-Ф: к 30 *мг* бариевой соли Р-5-Ф добавляют 1 *мл* дистиллированной воды. Образовавшуюся взвесь растворяют, добавляя 1 *мл* 0,1н. раствора HCl. Для осаждения ионов бария к раствору прибавляют 0,5 *мл* 10%-ного раствора K_2SO_4. Смесь центрифугируют и проверяют на полноту осаждения ионов бария прибавлением 1 капли раствора сернокислого калия. При наличии осадка центрифугируют еще раз. Свободную от бария надосадочную жидкость доводят до pH 7,5 прибавлением 0,1н. раствора KOH (синее окрашивание по бромтимолблау). Объем раствора доводят дистиллированной водой до 8 *мл*. Сохранять в холодильнике; 3) 7,5%-ный раствор трихлоруксусной кислоты; 4) концентрированная серная кислота; 5) 3%-ный раствор цистеин-гидрохлорида.

Т е х н и к а. К 0,5 *мл* сыворотки добавляют 0,1 *мл* трис-буферного раствора и 0,4 *мл* раствора Р-5-Ф. Полученную смесь инкубируют в течение 3 час. при 37°. После инкубации добавляют 2 *мл* 7,5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Перемешивают и центрифугируют. К 1 *мл* безбелкового центрифугата быстро приливают 4 *мл* концентрированной H_2SO_4, энергично встряхивают и ставят на 10 мин. в ледяную воду. Затем пробирку с исследуемой пробой вынимают и оставляют стоять при комнатной температуре в течение 2 час. После этого приливают 0,1 *мл* 3%-ного раствора цистеин-гидрохлорида, встряхивают и оставляют при комнатной температуре. Через 24 часа измеряют оптическую плотность раствора при помощи электрофотоколориметра—ФЭК-Н-57 (фильтр с максимумом пропускания 508 *ммк* — № 4; кювета 10 *мм*, фотометрия против воды).

В параллельной контрольной пробе к 0,5 *мл* сыворотки добавляют 0,1 *мл* раствора трис-буфера и 2 *мл* 7,5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, а затем 0,4 *мл* раствора Р-5-Ф. В остальном поступают так же, как и с опытной пробой.

Активность ТК пропорциональна разности экстинкций между опытной и контрольной пробами ($E_{оп} — E_к$).

Расчет. Учитывая, что С-7-Ф имеет ту же молярную экстинкцию, что и свободная седогептулоза, наиболее правильно расчет производить по стандартной кривой, построенной при помощи седогептулозы, а активность ТК выражать в *мкмолях* образовавшегося С-7-Ф на 1 *мл* сыворотки за 1 час при 37°. Активность ТК, измеренная по приросту С-7-Р, в норме составляет 0,067±0,003 *мкмолей* на 1 *мл* за 1 час.

При отсутствии седогептулозы, необходимой для построения стандартной кривой, активность ТК можно выражать в условных единицах экстинкции, умноженных на 100. Тогда в норме ак-

тивность фермента колеблется от 3 до 10 ед. Точность метода около 5%.

Недостатком этой методики является длительное ее выполнение. После добавления к центрифугату концентрированной H_2SO_4 и цистеин-гидрохлорида пробу необходимо оставлять на 24 часа при комнатной температуре и лишь затем приступать к фотометрии.

Определение кинетики ферментативных реакций [42]

П р и н ц и п. При изучении кинетики ферментативных реакций в нижеописанном методе использован принцип вольтаметрии. Скорость ферментативной реакции измеряется по изменению потенциала между двумя платиновыми электродами, погруженными в реакционную смесь и подключенными к цепи постоянного тока силой 25 *мка*. Перегиб кривой деполяризации, выражающий изменение потенциала во времени, позволяет рассчитать относительную скорость ферментативного гидролиза.

Метод разработан применительно к определению кинетики ферментативного расщепления йодида ацетилтиохолина и йодида бутирилтиохолина в присутствии холинэстеразы или ацетилхолинэстеразы, по следующей схеме:

$$(CH_3)_3N\,(J)\,CH_2CH_2\,S\,COR \xrightarrow[pH\ \ 7,4]{хэ} (CH_3)_3N\,(J)\,CH_2CH_2SH + RCOOH.$$

Тиохолин, выделяющийся в результате ферментативного гидролиза йодида ацетилтиохолина, вызывает деполяризацию электрода и вследствие этого падение потенциала.

Авторами указана возможность применения метода для изучения кинетики реакций в других субстрат-ферментных системах.

Р е а к т и в ы: 1) субстраты: ацетилтиохолинйодид, бутирилтиохолинйодид или пропионилтиохолинйодид; одно из указанных веществ, в количестве, требуемом для приготовления 0,001 *М* раствора субстрата, растворяют в 25 *мл* буферного раствора триса (0,1 *М*, pH 7,4); 2) холинэстераза[1]: препарат, получаемый из лошадиной сыворотки, активность которого не должна быть ниже 1,9 *мкмолей* ацетилхолина, гидролизующегося 1 *мг* ферментного препарата в 1 мин., растворяют в трис-буферном растворе (0,1 *М*, pH 7,4); 3) ацетилхолинэстераза; очищенный препарат, получаемый из эритроцитов крупного скота (активность — 1,95 *мкмолей* ацетилхолина на 1 *мг/мин*), растворяют в том же буфере.

Все растворы перед опытом согревают в термостате до 25°.

Т е х н и к а. Раствор субстрата в количестве 25 *мл* перемешивается магнитной мешалкой, в него погружаются два платиновых электрода и стандартный каломельный электрод. Платиновые электроды подключаются к цепи постоянного тока, состоящей из 135-вольтовой батареи и двух сопротивлений:

[1] КФ 3.1.1.8.

270 *ом* и 2 *мегом*, сила тока — 25 *мка*. Отмечают начальный момент времени и вносят в реакционную смесь 1 *мл* фермента. Посредством вакуумного вольтметра, показания которого записываются на самописце, регистрируют изменение напряжения на аноде. Электродом сравнения служит стандартный каломельный электрод.

После каждого измерения электроды промывают дистиллированной водой.

Постановка контрольного опыта на спонтанный гидролиз. Скорость неферментативного гидролиза используемых в основном опыте субстратов определяют спектрофотометрически путем измерения и автоматической записи светопропускания при 412 *ммк*, что основано на образовании желтоокрашенного тиолового соединения. При точном соблюдении условий электрохимическое и спектрофотометрическое определения дают близко совпадающие результаты. Это указывает на то, что изменение потенциала зависит не от электродных реакций, а происходит в связи с ферментативным гидролизом.

Вычисление. Вычерчивают кривую изменения потенциала во времени. Наклон этой кривой $\Delta E/\Delta t$, согласно [43], позволяет рассчитать величину скорости гидролиза.

Как это следует из основного уравнения кинетики ферментативного действия

$$v = K_3 [E]_0 [S]_0/(K_м + [S]_0,$$

скорость гидролиза находится в линейной зависимости от концентрации фермента. Поскольку максимальная скорость гидролиза v_{max} равна K_3 (E), можно вычислить константу скорости распада фермент-субстратного комплекса K_3. При расчете максимальной скорости ферментативного гидролиза ацетилтиохолина и бутирилтиохолина концентрация холинэстеразы была принята равной $1{,}08 \times 10^{-10}$ M, а ацетилхолинэстеразы — $0{,}5 \times 10^{-10}$ M, где M — молярная концентрация (активность) фермента рассчитывается по формуле

$$M = \frac{\text{активность (концентрация)}}{\text{число перехода}} \times 10^{-3}.$$

Выражая активность в *мкмолях/мг/мин*, концентрацию в *мг/мл*, M в *молях/л* и принимая, согласно [42], число перехода для холинэстеразы и ацетилхолинэстеразы равным $3{,}0 \times 10^5$ мин.$^{-1}$ и $7{,}4 \times 10^5$ мин.$^{-1}$ соответственно, для вышеописанной системы можно рассчитать следующие значения кинетических констант:

Субстрат	$v_{макс}$ (M мин$^{-1} \times 10^5$)		$K_М$ ($M \times 10^4$)		K_3 (мин $\times 10^{-6}$)	
	Хэ	Ахэ	Хэ	Ахэ	Хэ	Ахэ
Ацетилтиохолин	6,0	4,6	10,0	1,4	5,5	9,2
Бутирилтиохолин	6,1	—	3,1	—	6,5	—

Константу Михаэлиса $K_М$, значения которой здесь приведены, рассчитывают согласно уравнению Михаэлиса—Ментена в форме:

$$v = vK_М/[S]_0 + v_{max} ,$$

откладывая скорость реакции v против $v/[S]_0$.

Влияние температуры на скорость ферментативного гидролиза, выраженное графически как зависимость $\ln R_0$ от $1/T$, позволяет по наклону кривой определить величину энергии активации.

Источники ошибок. Величины v_{max} и $K_М$, определяемые вышеописанным методом, разработанным на примере изучения кинетики ферментативного гидролиза эфиров тиохолина, дают хорошее совпадение с данными, полученными другими методами — титриметрическим, манометрическим и колориметрическим. Следует, однако, отметить, что наклон кривой $\Delta E/\Delta t$, являющийся мерой скорости реакции, в значительной степени зависит от силы тока. Градиент деполяризации, равный для описанной системы 12 *мв/сек* при силе тока 3,4 *мка*, падает до нуля при чрезмерном повышении последней. Это объясняется тем, что приложенное напряжение вызывает окисление йода. При высокой силе тока значительные количества освобождающегося йода реагируют с тиохолином, образующимся в результате гидролиза, таким путем удаляя его из реакционной среды.

Для того чтобы получить устойчивые воспроизводимые результаты измерений, необходимо присутствие некоторого количества иона йода. С этой целью рекомендуется добавить в реакционную смесь 1 *мл* 0,001 *М* раствора йодистого калия. Точность определения в вышеописанном методе не ниже 1%.

Метод применим для изучения кинетики многих других ферментных систем. Когда субстрат является неэлектролитом, следует подобрать и ввести в систему соответствующий медиатор. В разобранном случае роль медиатора выполняет ион йода, в системе глюкоза-глюкооксидаза в качестве медиатора можно использовать дифениламиносульфоновую кислоту. Если субстрат обладает определенными электролитными свойствами, как, например, перекись в системе пероксид—пероксидаза, необходимость в добавлении медиатора отпадает (см. также [44]).

Данных о проверке метода другими лабораториями пока не имеется.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Cori* et al. J. Biol. Chem., 1948, **151**, 39.
2. *Kurahashi K.* a. *Anderson E.* Bioch. Bioph. Acta, 1958, **29**, 498.
3. *Пасхина Т. С.* Методические письма, Ин-т биол. и мед. химии АМН СССР, вып. III, 1959.
4. *Loury O.* et al. J. Biol. Chem., 1954, **207**, 1.
5. *Pihar O.* a. *Svore* J. Clin. Chim. Acta, 1966, **13**, 735.
6. *Dorfman A.* et al. J. Biol. Chem., 1948, **172**, 367.

7. *Цончев В. Т.* и др. Лабораторная диагностика ревматических заболеваний. София, Медицина и физкультура, 1964, стр. 176.
8. *Colombo J.* et al. Klin. Wochenschr., 1962, N 40, 37.
9. *Sax S.* a. *Moore J.* Clin. Chem., 1965, **11**, 951.
10. *Цончев В. Т.* и др. см. [7], стр. 181.
11. *Hue A.* a. *Free A.* Clin. Chem., 1965, **11**, 708.
12. *Bodanski O.* Cancer, 1957, **10**, 859.
12a. *Асатиани В. С.* Биохимическая фотометрия. М., Изд-во АН СССР, 1957, стр. 654.
12b. *Noltmann E.* u. *Bruns F.* Z. physiol. Chem., 1958, **313**, 194.
13. *Bruns F.* Bioch. Z., 1954, **325**, 156.
13a. *Mejbaum W.* Z. physiol. Chem., 1939, **258**, 117.
14. *Bodanski O.* Cancer, 1954, **32**, 1041.
15. *Orlowski M.* Pol. Tyg. Lek., 1958, **13**, 1421.
16. *Gerlach V.* Klin. Wochenschr., 1959, N 37, 93.
17. *Henry R.* et al. Amer. J. Clin. Path., 1960, **34**, 381.
18. *Ressler N.* et al. J. Lab. a. Clin. Med., 1962, **60**, 349.
19. *Hess B.* u. *Gehm E.* Klin Wochenschr., 1955, N 33, 91.
20. *Barson A.* a. *Phillips G.* Clin. Chim. Acta, 1965, **12**, 210.
20a. *Nachlas M.* et al. Ann. Biochem., 1960, **1**, 317.
21. *Oper A.* et al. Clin. Chem., 1966, **12**, 308.
22. *Bergmeyer H.* Methoden der enzymatischen Analyse. Weinheim, 1962 757.
23. *Delbrück A.* et al. Bioch. Z., 1959, **331**, 273.
24. *Bergmeyer H.* см. [22], стр. 744.
25. *Henry R.* et. al. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1960, **104**, 620.
26. *Rice E.* a. *Cicone M.* Amer. J. Clin. Path., 1958, **29**, 90.
27. *Shimizu M.* et al. J. Biochem., 1961, **49**, 673.
28. *McCosker P.* Nature, 1961, **190**, 887.
28a. *Ravin H.* J. Lab. Clin. Med., 1961, **58**, 161.
28b. *Humoller F.* et al. Clin. Chem., 1958, **4**, 1.
29. *Richert A.* et al. J. Biol. Chem., 1949, **181**, 255.
30. *Kalkar O.* J. Biol. Chem., 1947, **167**, 429.
31. *Асатиани В. С.* Биохимическая фотометрия М., Изд-во АН СССР, 1957, 257.
32. По *Remy* Ch. et al. J. Biol. Chem., 1955, **217**., 293.
33. *Horn H.* u. *Bruns F.* Bioch. Z., 1958, **64**, 315.
34. *Bergmeyer H.*, см. [22], стр. 877.
35. *Straus W.* Bioch. Bioph. Acta, 1956, **19**, 58.
36. *Пушкина Н. Н.* Биохимические методы исследования. М., Медицина, 1963, 195.
37. *Симаков П. В.* Вопросы мед. химии, 1950, № 2, 47.
38. *Sibley J.* a. *Leninger A.* J. Biol. Chem., 1949, **177**, 859.
39. *Wolf H.* et al. Gastroenterologia, 1957, **87**, 172.
40. *Brown R.* a. *Grisolia S.* J. Lab. Clin. Med., 1959, **54**, 617.
41. *Островский Ю. М.* и *Требухина Д. В.* Вопросы мед. химии, 1962, № 2, 149.
42. *Guilbault G.* et al. Anal. Bioch., 1963, **5**, 208.
43. *Kramer D.* et al. Anal. Chem., 1962, **3**, 842.
44. *Wilson J.* a. *Harrison M.* J. Biol. Chem., 1961, **236**, 2292.

БОЛЕЗНИ, СОПРОВОЖДАЮЩИЕСЯ ИЗМЕНЕНИЕМ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Болезнь	Аф *	Литературный источник
Аденозиндезаминаза (КФ 3.5.4.4)		
Туберкулез легких	+	Letnansky K. u. Seelich T. Klin. Wschr., 1958, 36, 826
Злокачественные новообразования	+	Straub F. et al. Биохимия, 1957, 22, 118
Гепатит эпидемический	+	Smyth H., Irish J. Med. Sci., 1963, N 446, 59
Лейкемия	+	Sassowa J. Polski tygod lekar, 1962, 17, N 37, 1450
Миелома	+	J. Med. Soc., 1962, 68, N 1, 37
Аденозинтрифосфатаза (КФ 3.6.1.3)		
Гипертиреоз	+	Smejkal V., Smejkalova-Prazakova E. Endokrinologie, 1963, 44, N 3—4, 163
Гепатопатия острая	+	Indian J. Med. Sci., 1956, 10, N 8, 651
Сердечная недостаточность	+	Alpert Norman R. et al. Amer. J. Physiol., 1962, 202, N 5, 940
Гепатит инфекционный	+	De Ritis F. et al. Simpozium Europeo di Enzimologia Medica. Milano, 1960, стр. 28.
Альдолаза (Кетозо-1-фосфатальдолаза; КФ 4.1.2.7)		
Инфаркт миокарда	+	Добровольская Т. И. Терап. архив., 1963, № 11, 69
Гепатит инфекционный	+	Громашевская Л. Л. и др. Вопросы мед. химии, 1964, № 3, 246
Опухоли печени	+	Крусанова Н. И. и Красовская А. И. Вопросы онкологии, 1963, 9, 9
Гломерулонефрит	+	Orlowski M. Wiad. Lek., 1958, N 11/12, 555
Хронические воспалительные заболевания почек	+	Baraban H. Pol. Arch. Med. Wewn., 1961, 31, 7
Нефроз почек	+	Горбачева Ф. Е. Журн. невропатол. и психиатрии, 1963, № 7, 958.
Дистрофия мышц	+	Sibley I., Leninger A. J. Biol. Chem., 1949, 9, 303

* Аф — активность фермента: повышение +; понижение —.

Продолжение

Болезнь	Аф	Литературный источник
Миопатия (прогрессивная мышечная дистрофия)	+	Dreifus J., Schapira G. Enzymes muskulates et seriques en phatologie muskulaire. Basel, 1960
Рак простаты	+	Baker R. et al. J. Clin. Endocrinol., 1953, 13, 383
Лептоспироз	+	Зайкова Э. Ф. Клещевой энцефалит, лептоспирозы, листериоз, токсоплазмоз. Томск, 1963, стр. 38
Силикоз	+	Monteverde A. et al. Folia Med., 1963, 46, N 2, 125
Парадентоз	+	Бурков Т., Тодоров И. Стоматология, 1962, № 5, 1
Талассемия, талассодерепаноцитоз	+	Belfiore F. Boll. Soc. ital. biol. sperim., 1962, 38, N 11, 511
Брюшной тиф	+	Gustowska Irena. Polski tygod. lekar, 1962, 17, N 36, 1418
Злокачественные ретикулозы	+	Lamfirescu-Gheorghiu M. Studie ricercetari med. interna, 1963, 4, N 4, 483
Рак гортани	+	Laurini F. Arch. ital. laringol., 1963, 71, N 1, 65
Отравление четыреххлористым углеродом, хлорпромазином и другими токсическими веществами	+	Katz R., Ducci H. Amer. J. Digest. Dieseas, 1958, 3, 517
Миозит хронический Дерматомиозит	+ +	Щеклик Э. Клиническая ферментология. Варшава, 1966, стр. 405
Осложненная беременность	+	Mele G., Gascialli M. Arch. ital. sci. med. trop. e. parassitol., 1962, 43, N 4, 195
Правожелудочковая недостаточность сердца	+	Orlowski M. Pol. Tygod. lekar, 1958, 13, 851
Диабет	+	Pagliaro L. et al. Boll. Soc. ital. biol. sperim., 1963, 39, N 3, 134
Стабилизированные сердечные заболевания	+	Crosato M., Cappitelli G. Minerva pediatr., 1963, 15, N 13, 413
Лимфоидная лейкемия	+	Belfiore E., Meldolesi J. Boll. Soc. ital sperim., 1963, 39, N 13, 759; Corso P. et al. Arch. ital. sci. med. trop. e parassitol., 1962, 43, N 5, 241
Туберкулезный менингоэнцефалит	+	Licht E. Pediatr. polska, 1963, 38, N 4, 49
Пернициозная анемия (активность фермента повышается также в эритроцитах; активность в костном мозге выше, чем в периферической крови)	+	Heller P. et al. J. Lab. Clin. Med. 1960, 55, 425
Заболевания почек, в моче	+	Baraban H. Pol. Arch. Med. Wewn., 1961, 31, 155 Klaus D. Klin. Wschr., 1958, N 36, 207
Хирургическое удаление рака толстого кишечника, в опухолевой ткани	+	Sibley J., Fleisher G. Cancer Res., 1955, 15, 609

Болезнь	Аф	Литературный источник

Амилаза

(α-амилаза; КФ 3.2.1.1; β-амилаза; КФ 3.2.1.2)

Болезнь	Аф	Литературный источник
Астма бронхиальная	+	Щеклик Э. Клиническая ферментология. Варшава, 1966, стр. 176
Панкреатит острый	+	
Паротит	+	
Нефрит, в моче	—	
Прободная язва	+	Hogers F. Cal. for. ni a Med., 1960, 93, 6
Прием опиатов	+	Berk J. et al. Gastroenterology, 1960, 39, 702
Аппендицит острый	+	Тодоров Й. Клинические и лабораторные исследования. София, Медицина и физкультура, 1963, стр. 742
Воспаление слюнных желез	+	Short D. Scott. med. J., 1958, N 1, 305
Гепатит острый и хронический	—	
Осложненная беременность	—	Kokot E., Cekanski A. Gynek. Polska., 1958, 29, 131
Хронические заболевания почек и уремия	—	Тодоров Й. Клинические и лабораторные исследования. София, Медицина и физкультура, 1963, стр. 742
Сахарный диабет	—	
Кахексия	—	
Гипотиреоз	—	
Сифилис ЦНС	—	Marchionini A., Ottenstein B. Klin. Wschr., 1932, N 12, 1345
в спинномозговой жидкости	—	
в дуоденальном соке	—	
Гепатит острый	—	
Гепатит хронический	—	

Ангиотензиназа

(см. также ренин КФ 3.4.4.15)

Болезнь	Аф	Литературный источник
Цирроз печени, инфекционный гепатит, закупорка желчных путей	+	Kokubu T. et al. Clin. Chim. Acta, 1965, 12, 484

П р и м е ч а н и е. Кокубу и др. (Hiwada K., Kokubu F. et al. Clin. Chim. Acta, 1966, 14, 410) установили, что ангиотензиназная активность красных кровяных клеток значительно выше, чем плазмы.

Аргиназа

(КФ 3.5.3.1)

Болезнь	Аф	Литературный источник
Гепатит острый	+	Pelikan V. et al. Clin. Chim. acta, 1964, 9, 141

Арилфосфатаза

Болезнь	Аф	Литературный источник
Злокачественные опухоли желудка, толстого кишечника и кожи, в ткани	+	Dzialoszymski L. et al. Clin. Chim. Acta, 1966, 14, 450

Болезнь	Аф	Литературный источник
γ-Глютамилтранспептидаза (КФ 2.3.2.1)		
Опухоли	+	Szczeklik E. et al. Pol. Tygod Lekar. 1961, 16, 503
Нефроз, в моче	+	Orlowski M. et al. Pol. Tygod Lekar, 1958, 13, 1713
Поражения печени и желчных путей	+	Rutenburg A. M. et al. Gastroenterology, 1963, 45, N 1, 43 Gibinski R. et al. Polski tygod lekar, 1963, 18, N 47, 1752
Гепатит вирусный	+	Kokot F., Ruska J., Marassek J. L. ges. innere Med., 1963, 18, N 18, 851
Гексокиназа (КФ 2.7.1.1)		
Злокачественные опухоли	+	Нейфах С. А. и др. Вопросы онкологии, 1963, 9, № 5, 68
Гиалуронидаза (Гиалуронатлиаза; КФ 4.2.99.1)		
Ревматизм	+	Борисова Т. П., Миссерова Е. К. В сб. «Вопросы ревматизма и неспецифического инфекционного полиартрита у детей». М., 1962, 47
Эндомиокардит	+	Гинзбург Р. М. Врач. дело, 1962, № 9,23
Язва желудка	+	Павлющик А. В. Вопросы онкологии, 1963, № 4, 13
Рак желудка	+	Гередриев И. Ф. В сб. «Материалы совещания по актуальным вопросам клинической биохимии», 1962, 40, Рига
Нефрит	+	Чиж А. С. Здравоохр. Белоруссии, 1962, № 1, 24
α-Гидроксибутиратдегидрогеназа (КФ 1.1.1.61)		
Инфаркт миокарда	+	Шеклик Э. Клиническая ферментология. Варшава, 1966, стр. 229
Поражение паренхимы печени	+	
Дегидрогеназа β-оксимасляной кислоты		
Инфаркт миокарда	+	Elliott B. A. et al. Clin. Sci., 1962, 23, N 2, 305
Гиалуронатлиаза (КФ 4.2.99.1)		
Сахарный диабет, тяжелая почечная недостаточность с уремией	+	Orlikowska W. Pol. Tygod Lekar, 1961, 16, 263

Болезнь	Аф	Литературный источник
Гистидаза (Гистидинаммиаклиаза; КФ 4.3.1.3)		
Болезнь Боткина	+	Буробин и др. Вопросы мед. химии, 1963, 9, № 3, 322
Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа (Триозофосфатдегидрогеназа; КФ 1.2.1.9; 1.2.1.12; 1.2.1.13)		
Гепатит инфекционный		De Ritis F. et al. Simpozium Europeo di Enzimologia Medica, Milano, 1960, 28, 111
Глицерофосфатдегидрогеназа (КФ 1.1.99.5)		
Гепатит инфекционный		De Ritis F. et al Simpozium Europeo di Enzimologia Medica. Milano, 1960, 28, 111
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.49)		
Псориаз	+	Weber G. Arch. klin. und exptl. Dermatol., 1963, 215, N 6, 603
Различные формы анемии	+	Russe K. Blut, 1963, 9, N 6, 362 Dittrich R. Klin. Wschr., 1962, 40, N 20, 1075
Цирроз печени	+	Huber H. et al., Wiener Z. innere med. 1963, 44, N 1, 26
Малярия	—	Marotta Gaetano. Riv. malariol., 1961, 40, N 4—6, 183
Инфантильный пикноцитоз	—	Lannos-Mariolea Leda et al. Brit. J. Haematol., 1962, 8, N 3, 252
Фавизм	—	Fornaini G. Boll. Soc. ital. biol. sperim. 1962, 38, N 24, 1930 Reis Lesseps, Manso Carlos Gaz. méd portug., 1962, 15, N 1, 73
Острый хронический лейкоз	—	Щеклик Э. Клиническая ферментология, 1966, Варшава, стр. 354
Гемолитическая анемия	—	То же
Хронический миелоидный лейкоз	—	Belfore F. Boll. Soc. ital. biol. sperim., 1962, 38, N 11, 508
Глюкозофосфатизомераза (КФ 5.3.1.9)		
Гемолитическая анемия	—	Bodanski O. Cancer, 1955, 8, 1087
Лейкоз, рецидив и	+	
ремиссия	—	
Рак молочной железы с метастазами в кости (болезнь Ходжкина)	+	Bing R. et al. J. Amer. Med., Ass., 1957, 164, 647
Гепатит инфекционный	+	
Желтуха механическая	+	
Опухоль (метастаз)	+	
Инфаркт миокарда	+	Burn J. et al. Circul. Res. 1956, 4, 288
Миопатия (прогрессивная мышечная дистрофия)	+	Dreifus J., Schapira G. Ensymes musculares et seriques en pathologie musculare, Basel, 1960

Продолжение

Болезнь	Аф	Литературный источник
Глюкозофосфатизомераза (КФ 5.3.1.9)		
Липоидный нефроз почек	+	Martin G. Clin. Enzymology, Little Brown and comp. Boston — Toronto, 1958, 32
Сахарный диабет	+	Abderhalden R. Klin. Enzymologie. Stuttgart, Georg Thime Verlag, 1958
Заболевания почек, в моче	+	Baraban H. Pol. Arch. Med. Wewn., 1961, N 31, 155
Эксудативная жидкость опухолевого происхождения	+	Szczeklik E. et al. Pol. Tygod Lekar, 1961, 16, 941
Глюкозо-6-фосфатаза (КФ 3.1.3.9)		
Гепатит инфекционный	+	De Ritis F. et al. Simpozium Europeo di Enzimologia Medica. Milano, 1960, 28, 111
Поражения почек и слизистых желудочно-кишечного тракта	+	Доста Г. А., Островский Ю. М. Вопросы мед. химии, 1962, 8, № 5, 477
Глутаматдегидрогеназа (КФ 1.4.1.2)		
Хронический миелоидный лейкоз	+	
Лимфоидный лейкоз	+	Щеклик Э. Клиническая ферментология. Варшава, 1966, стр. 229
Поражение паренхимы печени	+	
Мышечная дистрофия		
β-Глюкуронидаза (КФ 3.2.1.31)		
Осложненная беременность	+	Abderhalden R. Klin. Enzymologie. Stuttgart., 1958
Рак легких (сильно повышена в плевральных эксудатах)	+	Hess B. Enzymes in Blood Plasma. New York, 1963, 11
Рак почек и мочевого пузыря	+	Richterich R. Enzymo-Pathologie. Berlin, 1958, 112
Ревматоидный артрит	+	Jacox R. a. Feldmann A. J. Clin. Invest., 1955, 34, 263
Рак мочевого пузыря, в моче	+	Irewis F., Plaice C. Brit. J. Cancer., 1960, 14, 106
Рак матки, во влагалищной жидкости	+	Щеклик Э. Клиническая ферментология. Варшава, 1966, стр. 183
Рак молочной железы, в моче	+	Whitaker B. Brit. J. Cancer., 1960, 14, 471
Глутатионредуктаза (КФ 1.6.4.2)		
Гепатит инфекционный	+	De Ritis F. et al. Simpozium Europeo di Enzimologia Medica. Milano, 1960, стр. 28

Болезнь	Аф	Литературный источник
Дегидрогеназа алкоголя (Алкогольдегидрогеназа; КФ 1.1.1.1)		
Гепатит инфекционный	+	De Ritis F. et al Simpozium Europeo di Enzimologia Medica. Milano, 1960, стр. 28 и след.
Дезоксирибонуклеаза (КФ 3.1.4.5)		
Некроз поджелудочной железы	+	Kowlessar O., Mc Evoy R. J. Clin. Invest., 1956, 35, 1325
Геморрагический панкреатит	+	De Ritis F. et al. Bull. Soc. ital. Biol. Sperim., 1956, 32, 1
Диаминоксидаза (гистаминаза) (КФ 1.4.3.6)		
Астма бронхиальная	+	Кирчев П. Соврем. медицина, 1962, № 5, 18
***l*-идитол (сорбитол)-дегидрогеназа** (*d*-идитолдегидрогеназа; КФ 1.1.1.15)		
Гепатиты	+	Gerlach U. Klin. Wschr., 1957, N 35, 1144
Изоцитратдегидрогеназа (КФ 1.1.1.41)		
Гепатит инфекционный	+	De Ritis F. et al. Simposium Europeo di Enzymologia Medica. Milano, 1960, стр. 28 и след.
Поражение паренхимы печени	+	
Осложненная беременность	+	Dawkins M. et al. Lancet, 1959, 11, 827
Новообразование в ЦНС, в спинномозговой жидкости	+	Van Rymenant M., Robert Z. Cancer, 1960, 13, 878
Карбоангидраза (Карбонатдегидратаза; КФ 4.2.1.1)		
Рак легкого	+	Пирадашвили Н. Э. Сакартвелос мецниеребата академиис моамбе, 1963, 30, № 5, 591. Тбилиси
Генуинная и травматическая эпилепсия	+	Смирнова Д. А. Журн. невропатол. и психиатрии, 1962, № 10, 1533
Канальцевый ацидоз почек	—	Elkinton J. et al. Amer. J. Med., 1960, 29, 554
Гинекологические воспаления	—	Сеидова М. М. В сб. «Труды Азер. Гос. ин-та усоверш. врачей», 1962, 5, 144
Анемия, в эритроцитах	—	Szot Z. Acta Bioch. Polon., 1955, 2, 135
Гемолитическая анемия, в моче	Следы	Robinson O. J. Clin. Path., 1950, 3, 142
Каталаза (КФ 1.11.1.6)		
Гепатит инфекционный	—	Turcu J. et al. Studii rIcercetari infra-microbiol. Acad. RPR, 1962, 13, 3, 385

Болезнь	Аф	Литературный источник
Каталаза (КФ 1.11.1.6)		
Акаталазия	Не обнаруживается	Kaziro F. et al. Chem. Ber., 1952, 85' 886
Хроническое воспаление придатков матки	—	Рибчиньска К. М. и др. Акушерство и гинекология, 1962, № 6, 50
Анемия различной этиологии	—	Рагимов Ш. Р. В сб. «Вопросы патологии кровообращения и системы крови». Баку, 1962, 200
Цирроз печени	—	Prokopowicz G. et al. Experientia, 1963, 19, N 9, 469
Рак легкого	—	Пирадашвили Н. З. Сакартвелос ССР Мецниеребата Академиис моамбе, 1963, № 5, 591. Тбилиси
Гипокаталазия, в эритроцитах и других тканях	Сильно понижена или отсутствует	Takahara S. и др. J. Clin. Invest., 1960, 39, 610
Новообразования, в печени, в опухоли	Уменьшается активность	Barahn B. Sitzber. Kgl. Press. Akad. Wiss., 1916, 20, 478
Кислая фосфатаза (КФ 3.1.3.2)		
Костные заболевания	+	Czitober H. et al. Klin. Wschr., 1963, N 21, 1068
Полиомиелит	+	Короткова А. И. Журн. Ленингр. научного об-ва невропатологов и психиатров, 1962, № 8, 239
Инфаркт миокарда	+	Schoenfeld Myron R. Science, 1963, 139, N 3549, 51
Рак предстательной железы, в железе	+	Woodard H. Cancer., 1956, 9, 352 Seal U. S. et al. Clin. Chem., 1966, 9, 620
Гиперфункция паращитовидной железы (при костных изменениях)	+	Gutman E. et al. Amer. J. Cancer., 1936, 28, 485
Рак предстательной железы	+	
Рак предстательной железы с метастазами в кости	+	Нанобашвили Д. М. Сакартвелос ССР Мецниеребата Академиис моамбе, 1962, 29, № 2, 159. Тбилиси
Ксантиноксидаза (КФ 1.2.3.2)		
Ксантинурия	+	Щеклик Э. Клиническая ферментология, 1966. Варшава, стр. 229

Болезнь	Аф	Литературный источник
Креатинкиназа (КФ 2.7.3.2)		
Инфаркт миокарда	+	Rozberg Robert. Acta clin. belg., 1962, 17, N 5, 392 Степанян Е. П. и др. Кардиология, 1964, 4, 27
Миопатия (прогрессивная мышечная дистрофия)	+	Гринко Л. П. Вопросы мед. химии, 1964, № 1, 70
Полиомиозит	+	Colombo J. et al. Klin. Wschr., 1962, N 37 Dreifus J. et al. Rev. franc. et biol., 1960, 5, 386
Дистрофия	+	Kuhn E. et al. Klin. Wochenschr., 1962, N 14, 744 Sibley J., Lehninger A. Journ. Biol. Chem., 1949, 9, 303
Инфекционные и токсические миокардиты (детские)	+	Тодоров Й. 1963. Клинические и лабораторные исследования. София, Медицина и физкультура, стр. 769.
Диабет	+	Schneider K. W., Heise E. R. Dtsch. med. Wschr., 1963, N 11, 520, 555, 556
Уремия	+	
Анемия	+	
Кома, вызванная окисью углерода	+	Bour H. Semaine Hopitaup, 1962, 38, N 73, 3152
Ревматический кардит	+	Toscani A. et al. Settimana med., 1963, 51, N 17, 801
Лактатдегидрогеназа (Лактатдегидрогеназа: КФ 1.1.1.27)		
Лейкоз острый хронический	+	Щеклик Э. Клиническая ферментология, 1966, стр. 229. Варшава
Анемия гемолитическая	+	
Анемия серповидноклеточная	+	
Инфаркт миокарда	+	Chinsky M. et al. Laborat. Clin. Med., 1956, 47, 108. Mayr R., Schweitzer F. Wiener med. Wschr., 1962, N 25—26, 505
Хирургические операции на сердце	+	Щеклик Э. Клиническая ферментология, 1966, стр. 229. Варшава
Гепатит инфекционный	+	То же
Опухоли печени	+	Zimmerman H., Weistein H. J. Lab. Clin. Med., 1956, 48, 607
Ревматизм	+	Щеклик Э. Клиническая ферментология, 1966. Варшава
Рак желудка	+	Prinotti Carlo et al. Minerw. med., 1962, 53, N 84, 3114. Schenker S. Amer. J. Digest. Dis., 1959, 4, 412
Поражения паренхимы почек, хронический нефрит	+	West M., Zimmerman H. J. Lab. Clin. Med., 1958, 52, 185
Дистрофия	+	Щеклик Э. Клиническая ферментология, 1966, стр. 229. Варшава
Гангрена	+	
Частые хирургические вмешательства	+	

Болезнь	Аф	Литературный источник
Лактатдегидрогеназа (Лактатдегидрогеназа: КФ 1.1.1.27)		
Миопатия (прогрессивная мышечная дистрофия)	+	Dreifus I., Schapira G. Ensymes musculares et seriques en pathologie musculare. Basel, 1960
Инфаркт легкого	+	Щеклик Э. Клиническая ферментология, 1966, стр. 295. Варшава
Осложненная беременность	+	Rimbach E. Enzimologia der Geburtshilfe. Jena, 1960
Рак легкого	+	Otrzonsek N., Kostrzenska K. Gruzlica ichoroby pluc, 1963, 31, N 9
Тиреотоксикоз	+	Щеклик Э. Клиническая ферментология, 1966, стр. 229. Варшава
Диабетическая кома	+	
Отравление CO и барбитуратами	+	
Лейкозы, рецидив и ремиссия	+	
Рак желудка, в желудочном соке	+	Schenker S. Amer. J. Digest. Dis., 1959, 4, 412
Протеинурия, в моче	+	Amelung D. et al. Klin. Wochenshr., 1958, № 36, 963. Grockson R. Lancet, 1961, 1, 140
Повреждения почек (особенно базального слоя клубочков), в моче	+	Kemp E., Laursen T., Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1960, 12, 463
Опухоли печени (в экссудативной и спинномозговой жидкости)	+	Wroblewski F. Cancer, 1959, 12, 27
Лейцинаминопептидаза (КФ 3.4.1.1)		
Желтуха механическая	+	Goldbarg J. et al. Cancer, 1958, 11, 283; см. также Miller et al. Brit. Med. J. 1960, 419
Опухоли печени	+	
Гепатит инфекционный	+	Nakagawa S. a. Tsuji H. Clin. Chim. Acta, 1966, 13, 155. De Ritis F. et al. Simpozium Europeo di Enzimologia Medica. Milano, 1960, 28, 111. Gills Goan P. et al. Amer. J. Diseases Children, 1963, 105, N 3, 256
Рак поджелудочной железы	+	Moseley Thad et al Amer. surgeon, 1963, 29, N 11, 771. Banks B. et al. New Engl. J. Med., 1960, 261, 203. Rutenburg A. et al. New Engl. J. Med., 1958, 259, 469
Аденома предстательной железы	+	Dastugue G. Ann. biol. clin., 1962, 20, N 7—9, 685
Инфаркт миокарда	+	Vokurkova J., Tovareky L. Z. ges. innere Med., 1963, 18, N 1, 24. Lukasik W. Ref. Simpozium Wefrob. W. Wroclawi, 1961, 23
Липаза (КФ 3.1.1.3)		
Гепатит острый Гепатит хронический	+	Connor W. a. Eckstein J. J. Clin. Invest., 1959, 38, 1746

Болезнь	Аф	Литературный источник
Липаза (КФ 3.1.1.3)		
Панкреатит острый	+	Chojecki Z. R. Arch. Med. Wewn., 1956, 26, 1
Рак поджелудочной железы	+	Nardi G. Castroenterology, 1960, 38, 50
Прободная язва	+	Щеклик Э. Клиническая ферментология, 1966, стр. 310. Варшава
Уремия и острая недостаточность почек	+	Тодоров Й. Клинические и лабораторные исследования. София, изд. «Медицина», 1963, стр. 744; Chojecki Z. R. Arch. Med. Wewn, 1956, 26, 1
Липаза липопротеиновая (липопротеинлипаза)		
Атеросклероз облитерирующий	—	Wroblewski F. Amer. J. Med., 1959, 27, 911
Анемия	—	
Инфекционные болезни	—	
Воспалительные заболевания	—	
Цирроз печени	—	Pitcher C. S. Williams Roger. Clin. Sci., 1963, 24, N 2, 239
Кистозный фиброз поджелудочной железы	—	Jakovcic Smilia et al. J. Pediatr., 1963, 62, N 1, 25
Липопротеаза		
Холецистит	+	Шарабарин Н. И. В сб. «Труды 2-й Всеросс. конф. детских врачей», 1963, 225
Гепатит инфекционный	+	
Малатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.37)		
Гепатит инфекционный (поражения печени), печеночная кома	+	De Ritis F. et al. Sympozium Europeo di Enzimologia Medica. Milano, 1960, стр. 28 и след.
Инфаркт миокарда	+	Щеклик Э. Клиническая ферментология. Варшава, 1966, стр. 229.
Тиреотоксикоз	+	То же
Хронический нефрит	+	»
Ревматизм	+	»
Отравление СО и барбитурами	+	»
Лимфогрануломатоз	+	Тодоров Й. Клинические и лабораторные исследования. София, издательство «Медицина», 1963, стр. 765
Лейкоз	+	
Токсическая беременность	+	Ricciardi F. et al. Arch. ostetr. e. ginecol., 1963, 68, N 1, 45

Болезнь	Аф	Литературный источник
Медь-оксидаза (ср. орто-дифенолоксидаза КФ 1.10.3)		
Инфаркт миокарда	+	Анщелевич Ю. В. Терап. архив, 1963, 35, № 7, 60
Гепатит эпидемический	+	Блюгер А. Ф. и др. В сб. «Материалы 1-го совещания по актуальным вопросам клинической биохимии». Рига, 1962, 45
Мурамидаза (лизоцим) (Мукопептид-гликогидролаза; КФ 3.2.1.17)		
Язвенный колит	+	Gray S. et al. Gastroenterology, 1950, 16, 687
Язвенный колит, в кале	+	Gray S. et al. Gastroenterology, 1950, 16, 687
Болезнь Крона (терминальный илеит), в кале	+	Meger K. et al. Amer. J. Med., 1948, 5, 496
Язва желудка	+	Meger K. et al. Amer. J. Med., 1948, 5, 482
Аллергические заболевания	+	Burghartz N., Quenzer K. Klin. Wschr., 1954, N 32, 977
Болезни почек, в моче	+	Burhartr W., Boosfeld E. Klin. Wschr., 1954, N 32, 182
НАДФ-диафораза (Дегидрогеназа восстановленного НАДФ; КФ 1.6.99.2)		
Канальцевый ацидоз почек	+	Lancet Editorial, 1961, N 1, 92
Нуклеотидаза (3′-нуклеотидаза; КФ 3.1.3.6)		
Цирроз печени (в тромбоцитах) и заболевания костной системы (в тромбоцитах)	+	Dixon Th. et al. J. Clin. Path., 1954 7, 341
5-Нуклеотидаза (КФ 3.1.3.5)		
Заболевание печени	+	Dixon Th., Purdom M. J. Clin. Path., 1954, 7, 341
Заболевание костей	+	Dixon Th., Purdom M. J. Clin. Path., 1954, 7, 341
Окситоциназа		
Паренхима печени	+	Klimek R., Pietrycka M. Clin. Chim. Acta, 1961, 6, 326
Орнитинкарбамоилтрансфераза (КФ 2.1.3.3)		
Гепатит инфекционный	+	Чаушуэм и др. Вопросы мед. химии, 1963, 9, № 4, 414
Астма бронхиальная	+	Colldahl H. Acta Med. Scand., 1960, 166, 399

Болезнь	Аф	Литературный источник
Ожог	+	Reichard H. Acta chirurg. scand., 1963, 126, N 1—2, 45
Гепатит острый	+	Тодоров Й. Клинические и лабораторные исследования. София, изд. «Медицина», 1963, стр. 767
Пептидаза		
Силикоз	+	Янев П. Борьба с силикозом. София, Медицина и физкультура, 1961, 142
Пероксидаза (КФ 1.11.1.7)		
Рак легкого	—	Пирадашвили Н. З. Сакартвелос мецниеребата академиис моамбе, 1963, 5, 591. Тбилиси
Пируваткиназа (КФ 2.7.1.40)		
Анемия гемолитическая	—	Boivin P., Mallarme J. Presse med. 1963, 71, 28 Brunetti P. et al. Haematologica, 1963, 47, 7, 505
Полипептидаза		
Гепатит эпидемический	+	Torjescu V. Med. interna, 1962, 14, N 8, 969
Ренин (КФ 3.4.4.15)		
Злокачественный нефросклероз	+	Щеклик Э. Клиническая ферментология, Варшава, 1966, стр. 196
Рибонуклеаза (КФ 2.7.7.16)		
Уремия	+	Connoly J. et al. But. J. Exptl. Pathol., 1962, 4, 402
Гипертиреоидные больные.	+	Leeper Robert D. J. Clin. Endocrinol. and Metabol., 1963, 5, 426 Aleksandrowiz J. Lancet, 1958, N 1, 640 Aleksandrowicz J. Spirer Arch. Immunol. Terap. Dosw., 1954, 2, 31
Сорбитдегидрогеназа (Алкогольдегидрогеназа; КФ 1.1.1.1)		
Гепатит инфекционный	+	De Ritis F. et al. Simpozium Europeo di Enzimologia Medica. Milano, 1960, стр. 28 и след.
Повреждения клеток печени	+	Тодоров Й. Клинические и лабораторные исследования. София, изд. «Медицина», 1963, стр. 765
Болезнь Боткина	+	Брагинский Д. М. и др. В сб. «Материалы 2-го Совещания по клинической биохимии инфекционных болезней и симпозиума по клинической биохимии болезней печени». Рига, 1963, 134
Хронические поражения печени	+	Хавченко Н. С. Там же, стр. 156

Болезнь	Аф	Литературный источник
Сукциндегидрогеназа (КФ 1.3.99.1)		
Цирроз печени	+	Pagliaro L. et al. Boll. Soc. ital. biol. sperim., 1963, 39, N 3, 140
Глиальные опухоли	+	Mossakowski Miroslaw G. G. Neuropathol. and Exptl Neurol., 1962, 21, N 1, 137
Сульфатазы (КФ 3.1.6.1)		
Новообразования	+	Rutenburg A., Seligman A. Arch. Biochem. Bioph., 1956, 60, 198
Рак мочевого пузыря	Уровень остается неизменным	Boyland E. et al. Brit. J. Cancer, 1955, 9, 62
Лейкозы		
Опухоли		
Воспаление мочеиспускательных путей		
Трансаминазы [аспартат (АСТ)- и аланин (АЛТ)-аминотрансферазы] (АСТ-КФ 2.6.1.1; АЛТ-КФ 2.6.1.2)		
Анемия серповидноклеточная	АСТ +	Щеклик Э. Клиническая ферментология, Варшава, 1966, стр. 215
Гепатит инфекционный	+	Комова З. А. и др. Клин. медицина, 1963, N 1, 100
Нефрит	АСТ +	La Due et al. Science, 1954, 120, 317. Chinsky M. et al. J. Labor. Clin. Med., 1956, 47, 108
Инфаркт миокарда	АСТ + АЛТ (сначала повышается, затем понижается)	Тригер В. А. и др. Врач. дело, 1964, № 1, 13
Очаговые изменения в мозге	+	
Травма мышц	+	
Дистрофия	+	
Миопатия (прогрессивная мышечная дистрофия)	+	Dreifus I., Schapira G. Enzymes musculares et seriques en patologie musculare. Basel, 1960
Липоидный нефроз почек	АСТ +	
Панкреатит острый	+	Paier J. et al. Castroenterologia, 1961, 95, 73
Осложненная беременность	+	Cekanski A., Kokot F. Gynek. Polska, 1961, 32, 565
Астма бронхиальная	+	Colldahl H. Acta Med. Scand., 1960, 166, 399
Гангрена	+	Розенберг П. К. Диссерт., 1952. Straub F., Ullman A. Bioch. biophys. acta, 1957, 23, 665

Болезнь	Аф	Литературный источник
Инфаркт легкого	+	Cohen G., Reckenberg H. Ann. Inst. Pasteur, 1956, 91, 693
Кровоизлияния в мозг	+	
Ревматизм у детей с поражением сердечно-сосудистой системы	+	Тарашкевич Ф. М. Педиатрия, 1964, № 2, 43
Дифтерийный миокардит	+	Choremis C., Leonidas J. Acta pediatr., 1962, 51, N 3, 293
Токсоплазмоз	АЛТ +	Skorczynski M. Angew. Parasitol., 1963, 3, N 2, 46
Инфекционный мононуклеоз	+	Stejskal J. Kania Ceskosl. pediatr, 1962, 17, N 5—6, 524
Псориоз	+	Gergely Lagesne, Riserl. orvostud., 1962, 14, N 3, 225
Желтуха механическая	+	Antos V. Vnitri lekar, 1963, 9, N 7, 682
Внепочечные заболевания желчных путей	+	Gastroenterology, 1963, 45, N 3, 345
Ожог	+	Bocanegra M. et al. Ann. Surg., 1963, 157, N 3, 438
Сотрясение мозга	+	Берзинь Ю. Э. и др. В сб. «Материалы 1-го Совещания по актуальным вопросам клин. биохимии», 1962, стр. 37, 40
Хроническая недостаточность кровообращения	+	Kedra M. Polski tygod. lekar, 1962, 17, N 15, 542
Гепатит амебный	+	Лопатина Л. А. В сб. «Труды ин-та краевой мед. АН Тадж. ССР», 1962, вып. 1, 108
Острое отравление никотином	+	Rengei B., Veress L., Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med., 1963, 54, N 2, 171
Менингит туберкулезный	+	Ostronska A., Owsinski J. Gruzlica i cnoroby plue, 1962, 30, N 10, 893
Рак печени	+	Ribotta G. et al. Chirurg. gen., 1962, 11, N 7, 708
Отравление четыреххлористым углеродом	+	Wroblewski F., La Due F. J. Lab. Clin. Med., 1954, 44, 958
Заболевания почек с протеинемией, в моче	+	Klous D., Klin. Wschr., 1958, 36, 207 Baraban H. Pol. Arch. Med. Wewn., 1961, 31, 245

Трипсин

(КФ 3.4.4.4)

Рак поджелудочной железы	+	Wardi G. Gastroenterology, 1960, 38, 50

Триозофосфатизомераза

(КФ 5.3.1.1)

Гепатит вирусный	+	Giusti G. et al, Acta hepatosplenol., 1963, 10, N 3, 166
Мышечная дистрофия	+	Giusti G. Boll. Soc. Ital. biol., sperim., 1962, 38, N 1, 19

Болезнь	Аф	Литературный источник
Уреаза (КФ 3.5.1.5)		
Цирроз печени	+	Rappoport W. J. Lab. and Clin. Med. 1963, 61, N 4, 550
Уропепсин (КФ 3.4.4.1)		
Острые хирургические состояния	+	Milik Jerzy. Polski Przegl. Chirurg., 1963, N 3, 205
Инфаркт миокарда	+	Kedra M. Markiewicz H. Polsk. Arch. Med. Wewn., 1959, 39, 1479
		Fučik M. et al. Gastroenterologia, 1960, 93, 79
		Florkiewicz H. Pol. Tygod Lekar, Wiad. Lek., 1959, 14, 1425
		Kedra M., Markiewicz M. Pol. Arch. Med. Wewn., 1960, 30, 808
		Gragzei H. et al. Diabets, 1957, 6, 480
Фосфогексоизомераза (Глюкозофосфатизомераза; КФ 5.3.1.9)		
Болезнь Боткина	+	Консисторум А. В. Лабораторное дело, 1962, № 11, 27
		Зайкова Э. Ф. В сб. «Труды Омского мед. ин-та», 1963, № 38, 139
Опухоли различные	+	Kotlarek-Haus Sabina. Polski tygod lekar, 1962, 17, N 30, 1173
		Lanzara G. Minerva chirurg., 1962, 17, N 19, 945
Фосфоглюкомутаза (Глюкозофосфомутаза; КФ 2.7.5.1)		
Гепатит инфекционный	+	De Ritis F. et al. Simpozium Europeo di Enzimologia Medica. Milano, 1960, стр. 28 и след.
Фосфомоноэстераза (Фосфатаза КФ 3.1.3.1 и КФ 3.1.3.2)		
Желтуха механическая	+	Покровский А. А. В кн.: «Химические основы процессов жизнедеятельности». М. Медгиз, 1962, стр. 275
Желтая атрофия печени	+	
Метастатический рак печени	+	
Рахит	+	Keiding R. Scand. J. Clin. a. Lab. Invest., 1959, 11, 106; Corner B. Arch. Dis. Childr., 1944, 19, 68
Остеомаляции	+	Abderhalden R. Klin. Enzymol. Stuttgart, G. Thieme Verlag, 1958 Gsell O., Boesch F. Praxis, 1948, 37, 223
Остеобластические саркомы	+	Покровский А. А. В кн. «Химические основы процессов жизнедеятельности», М., Медгиз, 1962, стр. 276

Болезнь	Аф	Литературный источник
Фосфопируватгидратаза (КФ 4.2.1.11)		
Гепатит инфекционный	+	De Ritis F. et al. Simpozium Europeo di Enzymologia Medica. Milano, 1960, стр. 28 и след.
Фруктозомонофосфатальдолаза (Керозо-1-фосфат-альдолаза КФ 4.1.2.7)		
Гепатит инфекционный	+	De Ritis F. et al. Simpozium Europeo di Enzimologia Medica. Milano, 1960, стр. 28 и след.
Фумаратгидратаза (КФ 4.2.1.2)		
Гепатит инфекционный	+	De Ritis F. et al. Simpozium Europeo di Enzymologia Medica. Milano, 1960, стр. 28 и след.
Хининоксидаза		
Гепатит инфекционный	+	De Ritis F. et al. Simpozium Europeo di Enzymologia Medica. Milano, 1960, стр. 28 и след.
Болезнь Боткина	+	Зайкова Э. Ф. В сб. «Труды Омского мед. ин-та», 1963, № 38, 149
Холинэстераза (КФ 3.1.1.8)		
Липоидный нефроз (гипер-α-глобулинемия)	+	Martin G. Clin. Enzymology. Little Brown and Comp. Boston. Toronto, 1958, 32. Orlowski, M. et al. Pol. Tygod Lekar, 1958, 13, 1713
Ожирение и экссудативная энтеропатия	+	Тодоров Й. Клинические и лабораторные исследования. София, «Медицина», стр. 738
Нефроз	+	Покровский А. В кн. «Химические основы процессов жизнедеятельности», М., Медгиз, 1962, стр. 285
Туберкулез легких	+	Аверина Е. П. Врач. дело, 1962, № 10, 69
Стенокардия	+	Квитко Г. и др. В сб. «Научные труды центр. ин-та эксперим. трудоспособн. и организ. труда инвалидов», 1962, вып. 2, 159
Опухоли печени	—	Wills E. Bioch. J., 1955, 60, 529
Гепатит инфекционный	—	
Инфаркт миокарда	—	Heinecker R., Mager I. Klin. Wschr., 1957, 35, 340
		Oka M. Acta Med. Scand., 1954, 150, 313
Дистрофия мышц	—	Щеклик Э. Клиническая ферментология, Варшава, 1966, стр. 401
Гломерулонефрит	—	Orlowski M. Wiad. Lekar, 1958, N 11/12 555

Болезнь	АФ	Литературный источник
Осложненная беременность . . .	—	Kokot E., Cekanski A. Gynek. Polska, 1958, 29, 131
Астма бронхиальная	—	Chachaj N. Kowal-Gierezak. Pol. Tygod Lekar, 1961, 16, 421
Заболевания паренхимы печени . .	—	Тодоров Й. Клинические и лабораторные исследования. София, изд. «Медицина», 1963, стр. 737, 738
Цирроз печени	—	
Дефектпротеинемия	—	

Цитохромоксидаза
(КФ 1.2.3.1)

Болезнь	АФ	Литературный источник
В опухолевых тканях	+	Du Bois K., Potter V. Cancer Res. 1942, 2, 290

Щелочная фосфатаза
(КФ 3.1.3.1)

Болезнь	АФ	Литературный источник
Дизентерия, колит	+	Абасов И. Т. Вопросы онкологии, 1962, N 7, 68
Почечная аденокарцинома	+	Amador Ebas et al. J. Amer. Med. Ass., 1963, 185, N 10, 769
Красная полицитемия	+	Anstey L. et al. Brit. J. Haematol., 1963, 9, N 1, 91
Остеомиелит	+	Bedogni C., Pinamonti F. Arch. ospedale mar., 1962, 14, N 2, 311
Скарлатина	+	Bertolotti E., Quarra G. F. Minerwa pediatr., 1963, 15, N 18, 602
Остеопатия	+	Kotzaurek R., Jesserer H. Wiener Klin. Wschr., 1962, N 46, 824
Церебральные спастические парезы	+	Меженина Е. П. В сб. «Вопросы травматологии, ортопедии и восстановительной хирургии». Донецк, 1961, 172
Туберкулез костно-суставный	+	Pinamonti F. et al Arch. ospedale mar. 1962, 14, N 2, 296
Гепатит инфекционный	+	De Ritis F. et al. Simpozium Europeo di Enzymologia Medica. Milano, 1960, стр. 28 и след.
		Stanosek Jozef et al. Przegl. epidemiol., 1962, 16, N 2, 143
Канальцевая нефропатия	—	Pollak E. et al J. Clin. Invest., 1960, 39, 1386
Диффузное воспаление почечных клубочков	+	Щеклик Э. Клиническая ферментология. Варшава, 196, стр. 372
Гиперфункция паращитовидной железы	+	Abderhalden R Klin. Enzymologie. Stuttgart, 1958, 6, 64
Лимфогрануломатоз	+	Щеклик Э. Клиническая ферментология, Варшава, 1956, стр. 358
Осложненная беременность	+	Там же, стр. 333
Гипофосфатазия	—	Fraser D. et al Lancet, 1955, 1, 286
Рахит	+ (или норма	Robinson R. Biochem. J., 1923, 17, 266
Болезнь Педжета (деформирующий остеит)	+	Hirsch W. Münch. Med. Wschr., 1955, 97, 687

Болезнь	Аф	Литературный источник
Гиперфункция паращитовидной железы. Болезнь Реклингаузена (фиброзный остеит)	+	Albright E. et al. Amer. J. Dis. Child., 1937, 54, 529
Остеосаркома	+	
Метастатический рак кости	+	Franseen C. a. McLean R. Amer. J. Cancer, 1935, 24, 299
Саркомы	+	
Рак паращитовидной железы	+	Щеклик Э. Клиническая ферментология. Варшава, 1966, стр. 378
Аденома паращитовидных желез	+	Gutman A. et al. Arch. Int. Med., 1936, 57, 379
Желтуха механическая и билиарный цирроз печени	+	Roberts W. Brit. J. Exptl Path., 1930, 11, 90; Gutman A. et al. J. Clin. Invest., 1940, 19, 129
Метастазы опухолей в печень	+	Flood C. et al. Arch. Int. Med., 1937, 59, 981; Shay H. et al., J. Lab. Clin. Med., 1954, 43, 741
Лейкоз	+	Тодоров Й. Клинические и лабораторные исследования. София, изд. «Медицина», 1963, стр. 478
Костный туберкулез	+	
Почечный рахит	+	
Грудная жаба	+	Аншелевич Ю. В. Кардиология, 1964, № 1, 72
Инфаркт миокарда	+	
Рак легкого	+	Черных О. В. Вопросы онкологии, 1964, № 1, 24
Дизентерия	+	Абасов И. Т. Вопросы онкологии, 1962, № 7, 68
Аденокарцинома печени	+	Amador E. et al. J. Amer. Med. Ass., 1963, 10, 769
Жировые перерождения печени	+	Bradus S. et al. Amer. J. Med., 1963, № 1, 246
Скарлатина	+	Bertolotti E., Quarra G. Minerva pediatr., 1963, 18, 602
Дифтерит (в лейкоцитах)	+	
Хронический миелоз (незадолго до смерти)	+	Fischer K. Klin. Wschr., 1963, N 13, 663
Хронический миелоз	−	Keiser G., Alsleben U. Schweiz. med. Wschr., 1963, N 1, 1
Вторичный бластоматоз скелета	+	Kotzaurek R., Jesserer H. Wiener Klin. Wschr., 1962, N 46, 824
Церебральные спастические парезы	−	Меженина Е. П. В сб. «Вопросы травматологии, ортопедии и восстановительной хирургии». Донецк, 1961, 172

Энтерокиназа

(Энтеропептидаза; КФ 3.4.4.8)

Дизентерия	+	Абасов И. Г. Вопросы онкологии, 1962, № 7, 68

ГЛАВА XVII

ЕДИНИЦЫ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Международной комиссией по ферментам рекомендуется следующее определение единицы фермента (Номенклатура ферментов. М., 1966, стр. 11): за единицу (E)[1] любого фермента принимается то количество его, которое катализирует превращение одного микромоля субстрата в минуту при заданных стандартных условиях.

Необходимо особо упомянуть о двух специальных случаях:

1. Если субстратом служит белок, полисахарид или иная молекула, в которой фермент атакует более одной связи, то вместо «микромоль субстрата» следует говорить «микроэквивалент затронутых реакцией групп». Иными словами, за меру скорости реакции принимается число расщепленных пептидных или гликозидных связей, а не общее число подвергшихся гидролизу молекул. Было бы явно ошибочным приравнивать гидролиз молекулы синтетического субстрата-пептида, содержащего одну пептидную связь, к гидролизу молекулы белка, содержащей множество расщепляемых ферментом связей.

2. При бимолекулярной реакции типа $A + B = C + D$ за основу расчета можно принять 1 *мкмоль* субстрата А или 1 *мкмоль* субстрата В, однако в специальном случае, когда реакция происходит между двумя идентичными молекулами, т. е. когда $B = A$, основой расчета должны служить 2 *мкмоля* А. Во всех случаях за единицу измерения скорости реакций принимается один полный цикл превращения.

Что касается условий реакции, то должна быть указана температура[2]; там, где это возможно, рекомендуется придерживаться температуры 30°. Проведение измерений при одной стандартной температуре представляет большие преимущества, так как позволяет сравнивать активности различных ферментов. Указанная темпе-

[1] Сокращение E применимо в текстах на русском и немецком языках; на английском, французском, итальянском, испанском языках ему соответствует сокращение U.

[2] В первом издании этого Отчета в качестве стандартной предлагалась температура 25°. Однако поступили указания на то, что в связи с уровнем окружающей температуры в помещениях соблюдение этого стандарта для многих лабораторий было бы затруднительным.

ратура достаточно высока для обеспечения приемлемого уровня активности и в то же время достаточно низка, чтобы избежать тепловой денатурации большинства ферментов.

Остальные условия, особенно pH и концентрации субстратов, должны по возможности быть оптимальными.

Рекомендуется, чтобы определения активности ферментов основывались на измерении начальной скорости реакции, а не на количестве субстрата, превращенного к концу определенного периода времени, если нет уверенности в том, что скорость реакции на протяжении этого периода остается постоянной. Если за этот период скорость реакции заметно снижается, например вследствие образования тормозящих продуктов реакции или (при работе с обратимыми системами) вследствие того, что обратная реакция достигает ощутимой скорости, то количество превращенного субстрата не будет пропорционально количеству присутствующего в системе фермента.

Для облегчения измерения начальной скорости желательно, чтобы исходная концентрация субстрата была достаточной для насыщения фермента, с тем чтобы в стандартном тесте кинетика реакции приближалась к кинетике нулевого порядка. В некоторых случаях это неосуществимо из-за ограниченной растворимости субстрата, его трудной доступности или ввиду малого сродства фермента к субстрату. В таких случаях рекомендуется определить константу Михаэлиса, что позволяет произвести перерасчет от наблюдаемой скорости реакции к той, которая соответствует полному насыщению фермента субстратом.

Единица, определение которой дано выше, представляет собой абсолютную величину, позволяющую сопоставлять активность различных ферментов. Однако разные ферменты очень сильно различаются по активности; в крайних случаях — в миллионы раз. Поэтому при выражении активностей в одних и тех же единицах могут встречаться чрезмерно малые и чрезмерно большие величины, что создает некоторые неудобства. Во избежание этого предлагается использовать префиксы метрической системы и считать допустимым выражать результаты определений в миллиединицах (*мЕ*), килоединицах (*кЕ*) и т. д.

Остаются те ферменты, активность которых обычно выражают не в величинах определенного химического превращения, а в величинах того или иного физического изменения, например изменения вязкости раствора. Пока скорость химической реакции, катализируемой такими ферментами, неизвестна, их активность не может быть выражена в указанных выше стандартных единицах. Однако нет оснований отказываться от определения пересчетных множителей, позволяющих количественно связать физические изменения с величинами химических превращений или непосредственно с числом имеющихся налицо единиц фермента. Желательно, чтобы такие пересчетные множители были выведены во всех возможных

случаях. Там, где между физическими и химическими изменениями нет взаимной пропорциональности, не должно представить затруднений построение кривых, по которым может быть отсчитано число единиц фермента.

Производные величины

Исходя из указанного определения единицы количества фермента, можно в значениях этой единицы выражать и другие принятые в энзимологии величины.

Концентрация раствора фермента (в отличие от степени его чистоты) обычно приводится в единицах активности на 1 *мл* раствора.

Удельная активность ферментного препарата выражается числом единиц на 1 *мг* белка. Эта величина стоит в прямом соотношении со степенью чистоты препарата. Если известна удельная активность чистого фермента (в единицах на 1 *мг* фермента), то частное от деления удельной активности исследуемого препарата на эту величину указывает степень чистоты последнего, т. е. долю общего белка, приходящуюся на чистый фермент.

Молекулярная активность выражает число молекул субстрата (или эквивалентов затронутой группы), превращаемых за одну минуту одной молекулой фермента при оптимальной концентрации субстрата, или число ферментных единиц в 1 *мкмоле* фермента (это одно и то же, так как единица выражена в микромолях субстрата). Молекулярная активность соответствует одному из тех значений, которые в прошлом придавали термину «число оборотов».

Если фермент обладает характерной простетической группой или каталитическим центром, концентрация которых доступна измерению, то сила каталитического действия может быть выражена в величинах активности каталитического центра, т. е. числа молекул субстрата, превращаемых в одну минуту одним каталитическим центром. Эта величина соответствует другому значению термина «число оборотов». Активность каталитического центра совпадает с молекулярной активностью, если молекула фермента содержит один каталитический центр; если на молекулу фермента приходится *n* каталитических центров, то величина молекулярной активности в *n* раз больше активности каталитического центра.

Рекомендуется впредь не пользоваться термином «число оборотов» и заменять его одним из указанных выше терминов, вкладывая в него соответствующее содержание. Выражение «число оборотов» было полезным, пока его применяли в одном определенном смысле, но, когда его стали применять в различных смыслах, оно сделалось источником путаницы.

Краткий перечень определений

Стандартизация меры активности фермента не универсальна. Однако она является значительным шагом вперед по сравнению с существующим «разнобоем» в определении меры активности ферментов. До внедрения интернациональной единицы активности фермента в практику всех лабораторий приходится считаться с наличием самых разнообразных способов, взятых в основу биохимических нормативов активности ферментов. В ряде случаев полученные таким образом данные можно путем специального пересчета выразить в других единицах, что бывает полезно при ознакомлении с литературными источниками. В частности, это легко удается, когда активность фермента определяется оптическим путем, как, например, в реакциях дегидрогеназ [1] с НАД и НАДФ (или ферментов, которые участвуют в спаренных реакциях с такими дегидрогеназами).

Приводим определение единиц активности таких ферментов: единица Бюхера (ед. Б) — количество фермента, которое вызывает изменение экстинкции НАД-H_2 на 0,100 в течение 100 сек. в 1 *мл* раствора при 366 *ммк*, 25° (толщина слоя 10 *мм*);

единица Рэкера — интернациональная единица (ед. Р) — количество фермента, которое превращает (расщепляет) 1 *мкмоль* субстрата в течение 1 мин. при 25°;

единица Вроблевского (ед. В) — количество фермента, которое вызывает изменение экстинкции НАД-H_2 на 0,001 в течение 1 мин. в 3 *мл* раствора при 340 *ммк*, 23°;

единица Амелунга и Хорна (ед. АХ) — количество фермента, которое превращает 1 *мкмоль* субстрата в течение 1 часа при 25°.

Для пересчета:	в единицы:	надо умножить на:
ед. Р	ед. Б	55
	ед. В	2073,5
	ед. АХ	60
ед. Б	ед. Р	0,0182
	ед. В	37,7
	ед. АХ	1,09
ед. В	ед. Р	$4{,}82 \cdot 10^{-4}$
	ед. Б	0,0265
	ед. АХ	0,0289
ед. АХ	ед. Р	0,0167
	ед. Б	0,92
	ед. В	34,6

Приводим пример пересчета. Для НАД-H_2 и НАДФ-H_2 при 366 *ммк*: коэффициент экстинкции — 3,30 *см²/мкмоль*; следовательно, изменение экстинкции на $\Delta E = 0{,}100$(ед. Б) соответствует превращению НАД-H_2 (НАДФ-H_2) $\frac{0{,}100}{3{,}30} = 0{,}0303$ *мкмоля/мин*.

---

[1] КФ 1.4.1.5.

Таким образом, ед. Б.: $\Delta E_{366}/\Delta t = 0{,}100/100$ *сек.* $= 0{,}060$ мин., т. е. 0,0182 *мкмоля/мин.*

1 ед. Р (интерн. ед.) $\Delta C/\Delta t = 1$ *мкмоль/мин.*

Отсюда 1 ед. Р (интерн. ед.) = 55 ед. Б.

0,0182 ед. Р (интерн. ед.) = 1 ед. Б.

Экстинкции НАД - H_2 (или НАДФ-H_2) для 340 или 366 *ммк* пересчитывают при помощи фактора 1,89 (экстинкция E_{340}: экстинкцию $E_{366} = 6{,}22 : 3{,}30 = 1{,}89$).

Величины активности ферментов, полученные манометрическим путем, вычисляют следующим образом:

$$Q_{O_2} \text{ или } Q_{CO_2} \text{ или } Q_{\text{кислота}} = \frac{\textit{мм}^3 \text{ газа}}{\textit{мг} \text{ фермента} \cdot \text{час}} = \frac{\frac{1}{22{,}4} \textit{ мкмоля} \text{ газа}}{\textit{мг} \text{ фермента} \cdot 60 \text{ мин.}} =$$

$$= \frac{1}{1344} \textit{ мкмоля} \text{ газа/мин.} \cdot \textit{мг} = 7{,}45 \cdot 10^{-4} \textit{ мкмолей} \text{ газа/мин.} \cdot \textit{мг} \qquad (1)$$

Пример. Степень чистоты препарата фермента $Q_{O_2} = 20\,000$; следовательно, активность фермента $= 20\,000 \cdot 7{,}45 \cdot 10^{-4} = 14{,}9$ *мкмолей* субстрата/мин.·*мг*. Удельная активность по Рэкеру = =14,9 *ед/мг*.

«Число оборотов» (ЧО) $= \frac{\text{моль превращенного субстрата}}{\text{моль фермента} \cdot \text{мин.}} =$ удельной активности $\cdot\ 10^{-3}$ мол. вес фермента.

На стр. 647 даются некоторые материалы относительно единиц активности ферментов, приводимые в литературе при установлении «нормативов» для органов и тканей.

В работах ряда исследователей, монографиях и руководствах, опубликованных ранее, в том числе и упоминаемых в данной книге, активность ферментов указывается в различных единицах, отражающих специфику анализируемого материала, условия анализа и т. п. Поэтому мы сочли целесообразным дать здесь сводку единиц активности некоторых ферментов, методы определения которых приведены в книге.

ЕДИНИЦЫ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Фермент	Метод определения	Литературный источник	Единица активности
α-Амилаза КФ 3.2.1.1	Определение сахара	M. Somogyi. Proc. Soc. exp. Biol. Med., **32**, 538 (1934)	1 *мг*/30 мин., 100 *мл*
	Йод-крахмальный метод	C. Huggins a. P. S. Russel. Ann. Surg. **128**, 668 (1948)	1 *мг*/час., *мл*
	Йод-крахмальный метод	B. W. Smith u. H. J. Roe. J. Biol. Chem., **179**, 53 (1949)	10 *мг*/30 мин. 100 *мл*
α-Глицерофосфат-дегидрогеназа КФ 1.1.99.5	УФ-проба *, модифицированная	E. Schmidt, F. W. Schmidt u. E. Wildhirt. Klin. Wschr., N **36**, 280 (1958); E. Smhmidt u. F. W. Schmidt (частное сообщение)	Ед. Бюхера/*мл* pH 7,5; 25°
Альдолаза КФ 4.1.2.7	Колориметрический	J. A. Sibley a. A. L. Lehninger. J. Biol. Chem., **177**, 859 (1949)	*мм*³ФДФ**/час., *мл*, pH 8,6; 38°
	Колориметрический, модифицированный	F. H. Bruns. Biochem. Z., **325**, 156 (1954)	*мм*³ ФДФ /час. *мл*, pH 7,4; 37°
	УФ-проба, модифицированная	U. Stave. Z. Kinderheilkunde, **84**, 472 (1958)	Ед. Бюхера/*мл*, pH 7,4; 25°
	УФ-проба, модифицированная	E. Schmidt, F. W. Schmidt u. E. Wildhirt. Klin. Wschr., N 36, 280 (1958) E. Schmidt, F.W. Schmidt	Ед. Бюхера/*мл* pH 7,5; 25°
Аденозиндезаминаза КФ3.5.4.4	Определение отщепляемого NH_3	O. Bodanski in: Enzymes in Health and Disease. Thomas, Springfield, **3**, **309** (1960)	*мкг* NH_3-азота/час., *мл*
Аконитаза КФ 4.2.1.3	Определение цитрата, модифицированный метод	E. Beutler a. M. K. Y. Yeh. J. Lab. clin. Med., **54**, 456 (1959)	245 *мкг* цитрата/ /5 мин. или 0,085*мкмоля* аконитата/5 мин., в опыте; 37°
Алкогольдегидрогеназа КФ 1.1.1.1	УФ-проба, модифицированная	E. Schmidt, F. W. Schmidt u. E. Wildhirt. Klin. Wschr., N 36, 280 (1958)	Ед. Бюхера/*мл*, pH 7,5; 25°
Апираза КФ 3.6.1.5	Определение отщепщепляемого фосфора, pH 4,8	A. Meister. Science (Washington), **106**, 167 (1947)	*мкмоли*/час., *мл*

* Термин «УФ-проба» означает «спектрофотометрический метод определения».
** ФДФ — фруктозо-дифосфат.

Фермент	Метод определения	Литературный источник	Единица активности
Арилсульфатаза КФ 3.1.6.1	Субстрат: *п*-нитрофенилсульфат 0,005 *М* в 0,5 *М* ацетатном буфере	V. Huggins u. D. R. Smith. J. Biol. Chem., **170**, 39.1 (1947)	10 *мкг п*-нитрофенола в 10 *мл*/10 час., *мл*, pH 5,8; 37°
	Субстрат *п*-нитрофенил- и *п*-ацетилфенилсульфат	K. S. Dodgson u. B. Spencer. Bioch. J., **56**, 2 (1959)	*мкг* фенола/час. 100 *мл* 20—24°
Гексокиназа КФ 2.7.1.1	УФ-проба, модифицированная	A. Engelhardt-Gölkel, R. Löbel, W. Seitz u. J. Woller. Klin. Wschr. N 36, 462 (1958)	Ед. Бюхера/*мл*
	УФ-проба, модифицированная	E. Schmidt, F. W. Schmidt u. E. Wildhirt. Klin. Wschr., № 36, 280 (1958)	Ед. Бюхера/*мл*, pH 7,5; 25°
Глицеринальдегидфосфатдегидрогеназа КФ 1.2.1.9	УФ-проба, модифицированная	E. Schmidt, F. W. Schmidt u. E. Wildhirt. Klin. Wschr., № 36, 280 (1958); E. Schmidt u. F. W. Schmidt (частное сообщение)	Ед. Бюхера/*мл*, pH 7,5; 25°
Глюкозо-6-фосфатаза КФ 3.1.3.9	Определение P, отщепляемого глюкозо-6-фосфатом	H. Koide u. T. Oda. Clin. chim. Acta, **4**, 554 (1959)	*мг* P/час., *мл*, pH 6,5
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа КФ 1.1.1.49	УФ-проба	W. Kerppola, E. A. Nikkilä u. E. Pitkönen. Acta med. scand., **164**, 357 (1959)	Ед. Вроблевского/*мл*, pH 7,6; комнатная температура
	УФ-проба, модифицированная	E. Schmidt, F. W. Schmidt u. W. Wildhirt. Klin. Wschr., № 36, 280 (1958); E. Schmidt u. F. W. Schmidt (частное сообщение)	Ед. Бюхера/*мл*, pH 7,5; 25°
β-глюкуронидаза КФ 3.2.1.31	Субстрат: фенолфталеин	W. G. Fishman, B. Springer a. R. Brunetti. J. Biol. Chem., **173**, 449 (1948)	*мкг* фенолфталеин/час., 100 *мл*, pH 4,5; 38°
Глюкуронилтрансфераза КФ 2.4.1.7	Субстрат: *о*-аминофенол	J. M. Arias, B. A. Lowry a. J. M. London. J. Clin. Invest., **37**, 875 (1958).	*мкг о*-аминофенил-глюкуронида/40 мин., *мл*, pH 7,4; 37,5°

Продолжение

Фермент	Метод определения	Литературный источник	Единица активности
Глутаматдегидрогената КФ 1.4.1.2	УФ-проба	U. Gerlach. Klin. Wschr., № 35, 1144 (1957)	*мкмоли*/час., *мл*, pH 7,4; 25°
	УФ-проба, модифицированная	E. Schmidt, F. W. Schmidt u. E. Wildhirt. Klin. Wschr., № 36, 280 (1958); E. Schmidt, F. W. Schmidt (частное сообщение)	Ед. Бюхера/*мл*, pH 7,5; 25°
Глутаматпируваттрансаминаза КФ 2.6.1.2	УФ-проба, модифицированная	K. Henley a. J. Pollard. J. Lab. Clin. Med., 46, 785 (1955)	*мкмоли* пирувата/час., *мл*, pH 7,4; комнатная температура
	Колориметрический	F. Dekitis, M. Goltorti u. G. Giusti. Minerva med. Torino, 47, 1 (1956)	*мкмоли* пирувата/15 мин., *мл*, pH 7,4; 37°
	УФ-проба	F. Wroblewski a. J. S. La-Due. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 91, 569 (1956)	Ед. Вроблевского/*мл*, pH 7,4; 20—22°
	УФ-проба, модифицированная	U. Stave. Z. Kinderheilkunde, 84, 472 (1958)	Ед. Бюхера/*мл*, pH 7,2; 25°
	УФ-проба, модифицированная	E. Schmidt, F. W. Schmidt u. E. Wildhirt. Klin. Wschr., № 36, 280 (1958); E. Schmidt, F. W. Schmidt (частное сообщение)	Ед. Бюхера/*мл*, pH 7,5; 25°
	УФ-проба	G. Lindner. Dtsch. Med. Z., 12, 3 (1961)	Ед. Вроблевского/*мл*, pH 7,4; 25°
Глутаматоксалацетаттрансаминаза КФ 2.6.1.1	УФ-проба	F. Wroblewski a. J. S. La-Due. Ann. Intern. Med., 43, 345 (1955)	Ед. Вроблевского/*мл*, pH 7,4; 20—22°
	Колориметрический	F. De Ritis, M. Coltorti e. G. Giusti. Minerva med. Torino, 47, 1 (1956)	*мкмоли* OA*/15 мин., *мл*, pH 7,4; 37°
	УФ-проба	G. A. Fleisher, K. G. Wakim a. N. P. Goldstein. Proc. Staff Meetings Mayo Clin., 32, 188 (1957)	*мкмоли*/час., *мл*; 38°

* OA — оксалацетат.

Фермент	Метод определения	Литературный источник	Единица активности
Глутаматоксалацетаттрансаминаза КФ 2.6.1.1	УФ-проба, модифицированная	E. Schmidt, F. W. Schmidt u. E. Wildhirt. Klin. Wrsch., № 36, 280 (1958), E. Schmidt, F. W. Schmidt (частное сообщение)	Ед. Бюхера/*мл*, pH 7,5; 25°
	УФ-проба, модифицированная	U. Stave. Z. Kinderheilkunde, **84**, 472 (1958)	Ед. Бюхера/*мл*, pH 7,4; 25°
	УФ-проба	G. Lindner. Dtsch. med. J., **12**, 3 (1961)	Ед. Вроблевского/*мл*, pH 7,4; 25°
Глутатионредуктаза КФ 1.6.2.4	УФ-проба кофермент: НАД-H_2	H. D. Horn u. F. H. Bruns. Biochem. Z., **221**, 58 (1958)	*мкмоли*/час., *мл*, pH 6,2; 25°
	УФ-проба кофермент: НАДФ-H_2	C. Manso a. F. Wroblewski. J. Clin. Invest., **37**, 214 (1958)	Ед. Вроблевского/*мл*
Дезоксирибонуклеаза КФ 3.1.4.5	Субстрат: дезоксирибонуклеиновая кислота	K. Schreier, A. Raspe u. V. Heinke. Klin. Wschr. № 33, 1096 (1955)	*мкг* дезоксирибозы/4 час. *мл*, из 0,6%-ного раствора (0,5 *мл*) дезоксирибонуклеиновой кислоты pH 5,6; 37°
		O. D. Kowlessar a. R. K. McEvoy. J. Clin. Invest., **35**, 1325 (1956)	*мкг* дезоксирибозы/час., *мл*, 37°
Изоцитратдегидрогеназа КФ 1.1.1.41	УФ-проба	S. K. Wolfson jr. a. H. G. Williams-Ashman. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **36**, 231 (1957)	*мкмоль*/час., *мл*, pH 7,5; 25°
	УФ-проба	W. Kerppola, E. A. Nikkila u. E. Pitkänen. Acta med. scand., **164**, 357 (1959)	Ед. Вроблевского/*мл*, pH 7,6; $t°$ комнатная
	УФ-проба, модифицированная	E. Schmidt, F. W. Schmidt u. E. Wildhirt. Klin. Wschr., № 36, 280 (1958); E. Schmidt, F. W. Schmidt (частное сообщение)	Ед. Бюхера/*мл*, pH 7,5; 25°

Продолжение

Фермент	Метод определения	Литературный источник	Единица активности
Креатинфосфокиназа	Определение креатина, модификация	F. Schapira, J. C. Dreyfuss, G. Schapira et J. Demes. Rev. franc. Etud. clin. biol., **5**, 990 (1960)	*мкмоли* креатина/час., *мл*; 38°
Лактатдегидрогеназа (лактикодегидрогеназа) КФ 1.1.1.27	УФ-проба, модифицированная	F. Wroblewski a. J. S. La-Due. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **90**, 210 (1955)	Ед. Вроблевского/*мл*, рН 7,4; 24—27°
	УФ-проба	K. M. Hsieh a. H. T. Blumenthal. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **91**, 626 (1956)	*ммоли* пирувата/ /час.1000 *мл*; 32°
	УФ-проба, модифицированная	G. A. Fleisher, K. G. Walkim u. N. P. Goldstein. Proc. Staff Meetings Mayo Clin., **32**, 188 (1957)	*мкмоли* пирувата/час., *мл*; 37°
	УФ-проба, модифицированная	E. Schmidt, F. W. Schmidt u. F. Wildhirt. Klin. Wschr., № 36, 280 (1958); E. Schmidt, F. W. Schmidt (частное сообщение)	Ед. Бюхера/*мл*, рН 7,5; 25°
	УФ-проба, модифицированная	U. Stave. Z. Kinderheilkunde, **84**, 472 (1958)	Ед. Бюхера/*мл*, рН 7,6; 25°
	УФ-проба, модифицированная	A. Engelhardt-Gölkel, R. Löbel, W. Seitz u. J. Woller. Klin. Wschr. № 36, 462 (1958)	Ед. Бюхера/*мл*, рН 7,4; *t*° комнатная
Лейцинаминопептидаза КФ 3.4.1.1	Субстрат: лейцилглицин	G. A. Fleisher, H. R. Butt a. K. A. Huizenga. Ann. N. Y. Acad. Sci., **75**, 363 (1958)	*мкмоли*/час., *мл*, рН 7,7; 37°
		J. A. Goldbarg, E. Pineda a. A. M. Rutemberg. Amer. J. Clin. Pathol., **32**, 571 (1959)	1/12 *мкг* β-нафтиламина/2 час., 0,02 *мл*; 37°
Липаза КФ 3.1.1.3	Субстрат: оливковое масло	N. P. Goldstein u. J. H. Roe. J. Lab. Clin. Med., **28**, 1368 (1943)	*мкмоли*/24 час., *мл*
	Субстрат: оливковое масло, манометрический	D. H. Adams a. V. P. Whittaker. Biochem. J., **44**, 62 (1949)	*мкмоли*/20 час., *мл*
	Субстрат: оливковое масло, титрометрический, индикатол тимолфталеин	N. W. Tietz, T. Borden a. H. D. Stepleton. Amer. J. Clin. Pathol., **31**, 148 (1959)	*мл* 0,05 н. NaOH/ /6 час., *мл*

Фермент	Метод определения	Литературный источник	Единица активности
Малатдегидрогеназа КФ 1.1.1.37	УФ-проба, модифицированная	E. Schmidt, F. W. Schmidt u. E. Wildhirt. Klin. Wschr., № 36, 280 (1958); E. Schmidt u. F. W. Schmidt (частное сообщение)	Ед. Бюхера/*мл*, pH 7,5; 25°
	УФ-проба, модифицированная	A. Engelhardt-Gölkel, R. Löbel, W. Seitz u. J. Woller. Klin. Wschr., № 36, 462 (1958)	Ед. Бюхера/*мл*
5'-нуклеотидаза КФ 3.1.3.5	Субстрат: аденозин-5-монофосфорная кислота	Th. F. Dixon u. M. Purdom. J. Clin. Pathol., 7, 341 (1954)	*мг* фосфата/час., 100 *мл*, pH 7,5
	Субстрат: тот же, с добавлением ЭДТА	J. Young. Ann. N. Y. Acad. Sci., **75**, 357 (1958)	*мг* фосфата/час. 100 *мл*, pH 7,5
Орнитинкарбамилтрансфераза КФ 2.1.3.3	Проба с C^{14}-цитруллином	H. Reichard u. P. Reichard. J. Lab. Clin. Med., **52**, 709 (1958)	*мкмоли* CO^{14}_2/24 час., *мл*, 37°
	Определение цитруллина	R. W. Brown, u. S. Grisolia. J. Lab. Clin. Med., **54**, 617 (1959)	*мкмоли* цитруллина/15 мин.*мл*; 37°
Полифенолоксидаза КФ 1.10.3.1		H. Markowitz, C. J. Gubler, J. P. Mahoney, G. E. Cartwright u. M. W. Wintrobe. J. Clin. Invest., **34**, 1498 (1955)	*мкмоли* O_2/час., *мл*
Пируваткиназа КФ 2.7.1.40	УФ-проба, модифицированная	E. Schmidt, F. W. Schmidt u. E. Wildhirt. Klin.Wschr.,№ 36, 280 (1958)	Ед. Бюхера/*мл*, pH 7,5; 25°
	УФ-проба	M. van Rymenant u. J. Robert. Cancer, **12**, 1087 (1959)	Ед. Вроблевского/*мл*
Рибозо-5-фосфатизомераза КФ 5.3.1.6		F. H. Bruns. Biochem. Z., **327**, 523 (1956)	*мкмоли*/час·*мл*, 37°
Сорбитдегидрогеназа см. КФ 1.1.1.1.	УФ-проба, модифицированная	U. Gerlach. Klin. Wschr., № 37, 93 (1959)	$\Delta E^{366}_{0,001}$/мин., 3 *мл* пробы·*мл* pH 7,4; 24°
	УФ-проба, модифицированная	E. Schmidt u. F. W. Schmidt (частное сообщение)	Ед. Бюхера/*мл* pH 7,5; 25°

Фермент	Метод определения	Литературный источник	Единица активности
Сукциндегидрогеназа КФ 1.3.99.1	Восстановление $K_3Fe(CN)_6$, измерение при длине волны 400 *ммк*	A. Engelhardt-Gölkel, R. Löbel, W. Seitz u. J. Woller. Klin. Wschr., № 36, 462 (1958)	Ед. Бюхера/*мл*
Транскетолаза КФ 2.2.1.1	Определение образующегося седогептулозо-7-фосфата	F. H. Bruns, H. Dünwald u. E. Noltmann. Biochem. Z., **330**, 497 (1958)	*мкмоли/час, мл*, 37°
Трибутириназа см. КФ 3.1.1.3	Манометрический	W. Hause u. H. J. Leppelmann. Klin. Wschr., № 35, 65 (1957)	*мм*³ CO_2/*час*· ·0,04 *мл*
Триозофосфат-изомераза КФ 5.3.1.1	УФ-проба	R. Merten u. H. G. Solbach. Klin. Wschr., № 39, 222 (1961)	*мкмоли* диоксиацетонфосфата/ /мин., 1000 *мл*
Трипептидаза КФ 3.4.1.3	Субстрат: гли.гли. гли	G. A. Fleisher, H. R. Butt a. K. A. Huizenga. Ann. N. Y. Acad. Sci., **75**, 363 (1958)	*мкмоли/час., мл*
Фосфатаза кислая КФ 3.1.3.2	Субстрат: β-глицерофосфат; буфер: ацетатверонал	O. Bodanski. J. Biol. Chem., **101**, 93 (1933)	*мг* фосфора/час· · 100 *мл* pH 5; 37,5°
	Субстрат: фенилфосфат; буфер цитратный	E. J. King a. A. R. Armstrong. Canad. J. Med. Ass., **31**, 376 (1934) E. J. King a. A. R. Armstrong. Canad. J. Med. Ass., **32**, 379 (1935)	*мг* фенола/30 мин.·100 *мл* pH 5,0; 37,5°
	Субстрат: фенолфталеинфосфат; буфер ацетатный	V. Huggins u. P. Talalay. J. Biol. Chem., **159**, 399 (1945)	0,1 *мг* фенолфталеина/час., 100 *мл*, pH 5,4; 37°
Фосфатаза щелочная КФ 3.1.3.1	Субстрат: глицерофосфат; буфер: веронал	O. Bodanski. J. Biol. Chem., **101**, 93 (1933)	*мг* фосфора/час., 100 *мл*, pH 10,8; 37,5°
	Субстрат: фенилфосфат; буфер: веронал	E. J. King a. A. R. Armstrong. Canad. J. Med. Ass., **31**, 376 (1934) E. G. King a. A. R. Armstrong. Canad. J. Med. Ass., **32**, 379 (1935)	*мг* фенола/30 мин.·100 *мл*, pH 9,3; 37,5°
	Субстрат: фенолфталеинфосфат; буфер: веронал	C. Huggins a. P. Talalay. J. Biol. Chem., **159**, 399 (1945)	0,1 *мг* фенолфталеина/час., 100 *мл*, pH 9,7; 37°

Фермент	Метод определения	Литературный источник	Единица активности
Фосфатаза щелочная КФ 3.1.3.1	Субстрат: *n*-нитрофенилфосфат; буфер: глицин	O. A. Bessey, O. H. Lowry u. J. Brock. J. Biol. Chem., **164**, 321 (1946)	*ммоли* *n*-нитрофенола/час., 1000 *мл*, pH 10,3—10,4; 38°
	Субстрат: фенилфосфат; буфер: веронал	E. Kirberger u. G. A. Martini. Dtsch. Arch. klin. Med., **197**, 268 (1950)	*мг* фенола/мин. 100 *мл* плазма pH 9,0; 37°
	Модифицированный метод Кинга — Армстронга	D. Remy u. E. Gadermann. Dtsch. med. Wschr., **85**, 1061 (1960)	Ед. Кинга-Армстронга
Фосфогексозоизомераза КФ 5.3.1.9	Определение фруктозы	O. Bodanski. Cancer, **7**, 1191 (1954)	25 *г* фруктозы/ /30 мин·*мл*, pH 7,4; 37°
	Определение фруктозы	F. H. Bruns u. W. Jakob. Klin. Wschr., № 32, 1041 (1954)	*мм*^{3} Ф-6-Ф/час. *мл*; 37°
Фосфогексозомутаза см. КФ 2.7.5.1	Определение глюкозо-6-фосфата	O. Bodanski. Cancer, **10**, 859 (1957)	100 *мкмолей* Г-6-Ф/4 час., *мл*, pH 7,6; 37°
	Определение глюкозо-6-фосфата + + фруктозо- 6 -фосфат	E. Noltmann u. F. H. Bruns. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem., **313**, 194 (1958)	*мкмоли* Г-6-Ф + +Ф-6-Ф/час.,*мл*, 37°
Фосфоглицераткиназа КФ 2.7.2.3	УФ-проба	A. Engelhardt-Goäkel, R, Löbel, W. Seitz u. J. Woller. Klin. Wschr., № 36, 462 (1958)	Ед. Бюхера/*мл*; *t*° комнатная
Фосфоглицератмутаза КФ 5.4.2.1	УФ-проба	R. Merten u. H. G. Solbach. Klin. Wschr., № 39, 222 (1961)	*мкмоли* 3-фосфо-D-глицерата/ /мин., 1000 *мл*
6-фосфо-глюконатдегидрогеназа см. КФ 1.1.1.43	УФ-проба	S. K. Wolfson jr. a. H. G. Williams-Ashman. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **96**, 231 (1957)	*мкмоли* НАДФ-H_2/час., *мл*; 25°
	УФ-проба, модифицированная	E. Schmidt, F. W. Schmidt u. E. Wildhirt. Klin. Wschr., № 36, 280 (1958); E. Schmidt u F. W. Schmidt (частное сообщение)	Ед. Бюхера/*мл*, pH 7,5; 25°
Фосфорилаза КФ 2.4.1.1.	Определение фосфора, отщепляемого глюкозо-1-фосфатом	R. Merten u. H. G. Solbach. Klin. Wrsch., № 39, 222 (1961)	*мкмоли*/мин., 1000 *мл*

Окончание

Фермент	Метод определения	Литературный источник	Единица активности
Фосфофруктокиназа КФ 2.7.1.11	УФ-проба	R. Merten u. H. G. Solbach. Klin. Wschr., № 39, 222 (1961)	*мкмоли*/мин., 100 *мл*
Фруктозо-1-фосфатальдолаза см. КФ 4.1.2.13	УФ-проба	H. P. Wolf, G. Forster u. F. Leuthardt. Gastroenterology, 87, 172 (1957)	сек/$\Delta E^{366}_{0,1}$ (2 *мл* пробы), pH 7,5 (сыворотки); 25°
	УФ-проба, модифицированная	E. Schmidt u. F. W. Schmidt (частное сообщение)	Ед. Бюхера/*мл*, pH 7,5; 25°
Фумараза КФ 4.2.1.2	Спектрофотометрический	F. De Ritis, M. Coltorti u. G. Giusti. Clin. chim. Acta, **4**, 213 (1959)	Ед. Вроблевского/*мл*
Хининоксидаза	Спектрофотометрический	H. Baier. Klin. Wschr., № 36, 569 (1958)	$\Delta E^{366}_{0,001}$/10 мин. 4 *мл* пробы. *мл*
Холестеринэстераза КФ 3.1.1.13	Определение холестерина	K. B. Turner, G. H. MacCormack a. A. Richards. J. Clin. Invest., **32**, 801 (1953)	Уменьшение содержания свободного холестерина на 1%, 24 час.; 37°
Холинэстераза КФ 3.1.1.8	Колориметрический	D. W. Molander, M. M. Freidman a. J. S. LaDue. Ann. Intern. Med. **41**, 1139 (1954)	ΔpH/2 час., 0,1 *мл* 37°
	pH-метрический	R. Heinecker u. H. Losse. Klin. Wschr., № 33, 870 (1955)	ΔpH/2 час., 2 *мл*, 25°
	Манометрический	R. Ammon. Pflüger's Arch. ges. Physiol. Menschen, Tiere, **233**, 486 (1933)	*мкмоли* ацетилхолина/час., 0,05 *мл*, pH 7,4; 37°
Енолаза КФ 4.2.1.11	УФ-проба, модифицированная	E. Schmidt, F. W. Schmidt u. E. Wildhirt. Klin. Wschr., № 36, 280 (1958); E. Schmidt u. F. W. Schmidt (частное сообщение)	Ед. Бюхера/*мл*, pH 7,5; 25°
	УФ-проба	R. Merten u. H. G. Solbach. Klin. Wschr., № 39, 222 (1961)	*мкмоли*/мин., 1000 *мл*
Эстеразы КФ 3.1.1.2 3.1.1.1. 3.1.1.6	Субстрат: протеин	A. Fischer, L. Perenyi u. S. Rohmy. Acta med. Acad. Sci. hung., **12**, 229 (1958)	
	Субстрат: фенилбензоат		*мкг*/час., *мл*

ФЕРМЕНТЫ СЫВОРОТКИ КРОВИ, НАИБОЛЕЕ ЧАСТО ИССЛЕДУЕМЫЕ В МЕДИЦИНЕ, И МЕТОДЫ ИХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Фермент	Источник, откуда взят метод определения
Альдолаза (КФ 4.1.2.7 4.1.2.13)	Schneiderbauer A., Rettenbacher F. Wiener med. Wschr., 1960, **110**, 394
Алкогольдегидрогеназа (КФ 1.1.1.1)	Wolfson S. jr. et al. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1958, **75**, 260
Амилаза (α-амилаза, КФ 3.2.1.1; β-амилаза. КФ 3.2.1.2)	Janowitz H., Dreiling D. Amer. J. Med., 1959, **27**, 924
Аргиназа (КФ 3.5.3.1)	Manning R., Grisolia S. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1957, **95**, 225
Глицеринальдегидфосфатдегидрогеназа (КФ 1.2.1.9 1.2.1.12 1.2.1.13)	Schmidt E. et al. Klin. Wschr., 1958, № 36, 280
Глицерофосфатдегидрогеназа (КФ 1.1.99.5)	Giusti G. et al. Vortrag I. Europ. Symp. med. Enzymologie. Mailand, 1960
Глюкозо-6-фосфатаза (КФ 3.1.3.9)	Koide H., Oda T. Clin. chim. acta, 1959, **4**, 554
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.49)	Kerppola W. et al. Acta med. scand., 1959, **164**, 35
Глюкуронидаза, β (КФ 3.2.1.31)	Pineda E. et al. Gastroenterology, 1959, **36**, 202
Глюкуронилтрансфераза (см. Глюкуронидаза КФ 3.2.1.31)	Arias J. et al. J. Clin. Invest., 1958, **37**, 875
Глютатионредуктаза (КФ 1.6.4.2)	Monso C., Wroblewski F. J. Clin. Invest. 1958, **37**, 214
Гексокиназа (КФ 2.7.1.1)	Schmidt E. et al. Klin. Wschr., 1958, № 36, 280
Дезоксирибонуклеаза (КФ 3.1.4.5)	Levi A., Rottino A. Clin. Chem., 1960, **6**, 43
Енолаза (КФ 4.2.1.11)	Schmidt E. et al. Klin. Wschr., 1958, № 36, 280
Глютаматдегидрогеназа (КФ 1.4.1.2 1.4.1.3 1.4.1.4)	Gerlach U. Klin. Wschr., 1957, № 35, 1144
Изоцитратдегидрогеназа (КФ 1.1.1.41)	Sterkel R. et al. J. Lab. Clin. Med., 1958, **52**, 176
Лактатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.27 1.1.2.3)	Hess B. Verh. Dtsch. Ges. inn. Med., 1957, **63**, 541
Лейцинаминопептидаза (КФ 3.4.1.1)	Bressler R. et al. J. Lab. Clin. Med., 1960, **56**, 417
Липопротеинлипаза (см. липаза КФ 3.1.1.3)	Baker S. et al. Clin. Res., 1959, **7**, 291
Малатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.37)	Bing F. et al. J. Amer. Med. Ass., 1957, **164**, 647
5-нуклеотидаза (КФ 3.1.3.5)	Young J. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1958, **75**, 357
Орнитинкарбамилтрансфераза (КФ 2.1.3.3)	Reihard H. J. Lab. Clin. Med., 1961, **57**, 78

Фермент	Источник, откуда взят метод определения
Пепсиноген	Ronsky R. et al. Gastroenterologia, 1959, 91, 71
Пептидазы (см. КФ 3.4.4.1)	Fleisher G., Butt H. J. Clin. Invest., 1953, 32, 67
Пируваткиназа (КФ 2.7.1.40)	Schmidt E. et al. Klin. Wschr., 1958, № 36, 280
Полифенолоксидаза (КФ 1.10.3.1)	Richterich R. Vortrag l. Europ. Symp. med., Enzymologie. Mailand, 1960
Рибозо-5-фосфатизомераза (см. рибозофосфатизомераза КФ 5.3.1.6)	Bruns F. Bioch. Z., 1956, 327, 523
Оксимасляной кислоты (α-)-дегидрогеназа	Elliot B., Wilkinson J. Lancet, 1961, 699
Трансаминазы (см. КФ 2.6.1.1. и КФ 2.6.1.2)	Sommerville R., Fleisher G. Gastroenterology, 1960, 38, 926
Транскетолаза (КФ 2.2.1.1)	Bruns F. et al. Bioch. Z., 1958, 330, 497
Сорбитдегидрогеназа (КФ 1.1.1.2 1.1.1.1)	Wüst, Schön H. Klin. Wschr., 1961, № 39, 280
Фосфатазы (см. щелочная фосфатаза КФ 3.1.3.1; кислая фосфатаза КФ 3.1.3.2)	Gutman A. Amer. J. Med., 1959, 27, 875
Фосфогексозоизомераза (КФ 5.3.1.9)	Bodanski O. et al. Amer. J. Dis. Childr., 1959, 98, 166
Фосфоглюконатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.43)	Wolfson K. jr., Williams-Asman H. Fed. Proc., 1957, 16, 273
Фосфоглюкокиназа (КФ 2.7.1.10)	Engelgardt-Gölket A. et al. Klin. Wschr., 1958, № 36, 462
Фосфоглюкомутаза (КФ 2.7.5.1)	Di Ritis F., Giusti G. Giorn. mal. in infettive parassit., 1957, 9, 240
Фосфофруктальдолаза (см. КФ 4.1.2.13)	Rick W. Vortrag 1. Europ. Symp. med. Enzymologie, Mailand, 1960
Хининоксидаза	Roman W., Dulmanis A. Lancet, 1959, 90
Холестеринэстераза	Lewi A., Rottino A. Clin. Chem., 1960, 6, 43
Холинэстераза (КФ 3.1.1.8)	Magill G., Killough J. J. Lab. Clin. Med., 1958, 51, 333
Эстеразы (другие) (см. Эстераза А КФ 3.1.1.2 Эстераза В КФ 3.1.1.1 Эстераза С — животных тканей 3.1.1.6)	Fischer A. et al. Acta med. hung., 1958, 12, 229

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Аденозиндезаминаза (КФ 3.5.4.4)
Klein W. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 1961, **324**, 163.

Алкогольдегидрогеназа (КФ 1.1.1.1.1 1.1.1.2)
Racker E. J. Biol. Chem., 1950, **184**, 313.

Альдолаза (КФ 4.1.2.7 4.1.2.13)
Reisenherz G. et al. Z. Naturforsch., 1953, **8**, 555.

Гексокиназа (КФ 2.7.1.1)
Darrow R., Colowick S. In: Colowick S., Kaplan N. Methods in Enzymology. Acad — Press. New York, 1962, **5**, 226.

Глиоксалаза (см. глиоксалаза I КФ 4.4.1.5; глиоксалаза II КФ 3.1.2.6)
Racker E. J. Biol. Chem., 1951, **190**, 685.

Глиоксалатредуктаза (КФ1.1.1.26)
Zelitch J. J. Biol. Chem., 1955, **216**, 553; Holzer H., Holldorf A. Bioch. Z., 1957, **329**, 292.

Глицерин-1-фосфатдегидрогеназа (см. глицерофосфатдегидрогеназа КФ 1.1.99.5)
Reisenherz G. et al. Z. Naturforsch., 1953, **8 b**, 555.

Глицеринальдегид-3-фосфатдегидрогеназа (см. глицеральдегидрофосфатдегидрогеназа КФ 1.2.1.9 1.2.1.12 1.2.1.13)
Reisenherz G. et al. Z. Naturforsch., 1953, **8b**, 555.
Глицерокиназа (КФ 2.7.1.30)
Bergmeyer H.-U. et al. Bioch. Z., 1961, **333**, 471.

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.49)
Srere P. et. al. Arch.
Bioch. Bioph., 1958, **74**, 295.
Глюкозооксидаза (КФ 1.1.3.4)
Kusai K. et al. Bioch. Bioph. Acta, 1960, **40**, 555.

β-Глюкуронидаза и арилсульфатаза
(глюкуронидаза КФ 3.2.1.31; арилсульфатаза КФ 3.1.6.1)
Dodgson K., Spenser B. Bioch. J., 1953, **55**, 315.

α-Глютаматдегидрогеназа (КФ 1.4.1.2 1.4.1.3 1.4.1.4)
Olson J., Anfinsen C. J. Biol. Chem., 1952, **67**, 197.

Глютаматоксалацетаттрансаминаза (КФ 2.6.1.1)
Jenkins W. et al. J. Biol. Chem., 1959, **234**, 50.

Глютаматпируваттрансаминаза (КФ 2.6.1.2)
Grein L., Pfleiderer G. Bioch. Z., 1958, **330**, 433.

Глютатионредуктаза (КФ 1.6.4.2)
Racker E. In: Colowick S. Methods in Enzymology. Acad. Press, New York, 1955, 2, 722.

Гуаназа (КФ 3.5.4.3)
Kalckar H. J. Biol. Chem., 1947, **167**, 461.
Дифосфопиридиннуклеотид-никотинамидадениндинуклеотид, НАД
Kornberg A. In: Colowick S., Kaplan N. Methods in Enzymology. Acad. Pzess, New York, 1957, **3**, 876.

Енолаза (КФ 4.2.1.11)
Czok R., Bücher Th. Advances in Protein Chemistry, 1960, **15**, 373.

Изоцитратдегидрогеназа (КФ 1.1.1.41)
Sielert G. et al. Biol. Chem., 1957, **226**, 965.

Карбоксипептидаза (см. карбоксипептидаза А КФ 3.4.2.1; карбоксипептидаза В КФ 3.4.2.2)
Anson M. J. gen. Physiol., 1937, **20**, 663.

Каталаза (КФ 1.11.1.6)
Summer J., Dounce A. In: Colowick S., Kaplan N. Methods in Enzymology. Acad. Press, New York, 1955, **2**, 775.

Коэнзим А (КоА)
Decker K. Die aktivierte Essigsäure. F. Enke Verlag, Stuttgart, 1959.

Креатинфосфокиназа (КФ 2.7.3.2)
Kuby S. et al. J. Biol. Chem., 1954, **209**, 191.

Лактатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.27 1.1.2.3)
Beisenherz G. et al. Z. Naturforsch., 1953, **8 b**, 555.

Лейцинаминопептидаза (КФ 3.4.1.1)
Spackman D.et al. J. Biol. Chem., 1955, **212**, 255.

Липоксидаза (КФ 1.13.1.13)
Kies M. J. Biol. Chem., 1947, **170**, 121.

Малатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.37)
Lis H., Fasella P. Bioch. Bioph. Acta, 1959, **33**, 567.

Миокиназа (КФ 2.7.4.3)
Noda L., Kuby S. J. Biol. Chem., 1957, **226**, 541.
Никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ)
Horecker B. a. Kornberg A. In: Colowick S. a. Kaplan. N. Methods in Enzymology. Akad. Press, N. Y., 1957, **3**, 879.

Оксиацил-КоА-дегидрогеназа (КФ 1.1.1.38)
Grassl M. Dissert., Universität München, 1957;
Stern J. Bioch. Bioph. Acta. 1957, **26**, 448.

Пепсин (КФ 3.4.4.1)
Narthrop J. J. gen. Physiol., 1946, **30**, 177.

Пероксидаза (КФ 1.11.1.7)
Theorell. H. Enzymologia, 1942, **10**, 250.

Пируваткиназа (КФ 2.7.1.40)
Beinsenherz G. et al. Z. Naturforsch., 1953, **8 b**, 555.

Рибонуклеаза (КФ 2.7.7.16)
McDonald M. J. Gen. Physiol., 1948, **32**, 39.

Сахараза (КФ 3.2.1.26)
Hestrin S. et al. In: Colowick S., Kaplan N. Methods in Enzymology. Acad. Press, New York, 1955, **1**, 256.

Триозофосфатизомераза (КФ 5.3.1.1)
Beisenherz G. In: Colowick S., Kaplan N. Methods in Enzymology. Acad. Press, New York, 1955, **1**, 387.

Трипсин (КФ 3.4.4.4)
Kunitz M., Northrop J. J. Gen. Physiol., 1936, **19**, 991.

Уреаза (КФ 3.5.1.5)
Summer J. J. Biol. Chem., 1926, **69**, 435.

Уридинфосфоглюкозодегидрогеназа (КФ 1.1.1.22)
Strominger J. et al. J. Biol. Chem., 1957, **224**, 79.

Флавинадениндинуклеотид (ФАД)
Yagi K. et al. Biochemical Preparations. Wiley. New York, Chapman a. Hall. London, 1960, **7**, 51.

Флавинмононуклеотид (ФМН)
Huennekens F., Felton S. In: Colowick S., Kaplan N. Methods in Enzymology. Acad. Press, New York, 1957, **3**, 957.

Фосфатаза щелочная (КФ 3.1.3.1)
Morton R. Bioch. J., 1954, **57**, 595.

Фосфоглицераткиназа (КФ 2.7.2.3)
Bücher Th. Bioch. Bioph. Acta, 1947, **1**, 292.

3-Фосфоглицератмутаза (см. КФ 2.7.5.3)
Pizer T., Ballon C. J. Amer. Chem. Soc., 1957, **79**, 3612.

D-Фосфолипаза (КФ 3.1.4.4)
Casson C., Griffin F. Analyst, 1959, **84**, 281.

Фосфоглюкозоизомераза (см. КФ 5.3.1.9)
Moltmann E., Bruns F. Bioch. Z., 1959, 331, 436; Klotzsch H., Bergmeyer H. Angew. Chem., 1960, **72**, 920.

Фосфоглюкомутаза (КФ 2.7.5.1)
Najjar V. J. Biol. Chem., 1948, **175**, 281.

Фосфоглюконат-дегидрогеназа (КФ 1.1.1.43)
Horecker B., Smyriontis D. In: Colowick S., Kaplan N. Methods in Enzymology. Acad. Press, New York, 1955, **1**, 223; J. Biol. Chem., 1951, **193**, 371.

Фосфотрансацетилаза (КФ 2.3.1.8)
Stadtman E. In: Colowick S., Kaplan N. Methods in Enzymology. Acad. Press, New York, 1955, **1**, 596.

Химотрипсин (см. химотрипсин А КФ 3.4.4.5; химотрипсин В КФ 3.4.4.6)
Kunitz M., Northrop J. H. J. Gen. Physiol., 1936, **19**, 991.

ФЕРМЕНТНЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДРУГИХ ВЕЩЕСТВ

Определение аммиака [1]. Предложен ферментативный метод определения аммиака в крови, который может быть применен к концентрациям NH_4^+ не ниже 20 *мкг%*.

Прибор для определения АТФ [2]. Описана конструкция прибора для определения АТФ энзиматическим методом Мак-Элроз и Стрелера. Прибор измеряет концентрацию АТФ в пробе от 0,001 до 100 *мкг/мл* и автоматически регистрирует на диаграмме электронного самопишущего потенциометра ЭПП-09.

Определение гликогена и амилопектина [3]. Модификация метода, позволяющая вести анализ в тканевых экстрактах, содержащих сравнительно большие количества АДФ. Модификация состоит в последовательности добавления пробы и гексокиназы к реакционной, так чтобы АДФ отреагировала до начала главного опыта.

Определение гликогена [4]. Метод определения гликогена основан на том, что на одном этапе реакции:

$$\text{гликоген} + \text{неорганический фосфор} + \text{НАДФ} \rightarrow$$
$$\rightarrow \text{6-ф-глюконолактон} + \text{НАДФ-}H_2,$$

гликоген превращается в 6-Ф-глюконолактон; восстановленный при этом НАДФ-H_2 определяется по его флюоресценции или по поглощению в ультрафиолете. Точность метода — 0,05 *мкг* гликогена.

Описан также ферментативный метод определения гликогена печени [5, 6], основанный на расщеплении гликогена при помощи амилогликозидазы и определении образующейся глюкозы глюкозооксидазным способом.

Гликоген определяют в виде *d*-глюкозы с гексокиназой, пируваткиназой и лактатдегидрогеназой.

Определение глюкозы. Описан полуавтоматический ферментативный метод определения глюкозы в моче с применением глюкозооксидазы [7].

Предложено несколько модификаций способов определения *D*-глюкозы, в том числе быстрое измерение, серийные определения с автоматом для анализа [8—10], модификация для определения *D*-глюкозы в крови [11].

Некоторые исследователи определяют *D*-глюкозу, применяя глюкозо-оксидазу. Описанный метод основан на данных других

авторов, которые применяют вещества, окрашивающие анализируемые жидкости, например *o*-толидин или 2,6-дихлорфенол-индофенол [12].

D-глюкозу определяют и с гексокиназой [13]. Описан улучшенный метод для очистки гексокиназы. Полученный кристаллический фермент в 15 раз активнее сырого экстракта.

Для определения глюкозы можно анализировать другие гексомонофосфаты [14], при наличии достаточного количества соответствующего вспомогательного фермента, а именно фосфоглюкозоизомеразы, соответственно фосфоглюкозоизомераза плюс фосфоманнозаизомераза.

Определение глюконовой кислоты. Глюконокиназа и дегидрогеназа-6-фосфоглюконовой кислоты переводят глюконовую кислоту в рибулозо-5-фосфат и CO_2 при одновременном восстановлении эквивалентного количества НАД [15, 16].

Определение глютамата. Описывается [17] ферментативное определение глютамата, основанное на дегидрировании глютаминовой кислоты глютаматдегидрогеназой и восстановлении солей тетразолия до формазона при помощи *N*-метилфеназинметасульфата.

Определение гемицеллюлозы. Для определения простых, растворимых гемицеллюлоз может служить метод, на который указывает Говард [1], см. также [2].

Бесклеточная водная фаза, которая получается после извлечения бактериальной массы водным бутанолом при центрифугировании, содержит фермент, гидролизующий карбоксиметилцеллулозу, а также действующий как гемицеллулоза.

Определение гепарина. Предложен метод определения гепарина в сыворотке крови, основанный на способности гепарина подавлять активность РНК-азы.

Гепарин ингибирует некоторые ферментные реакции [20], а также расщепление циклических пиримидиннуклеотидов через рибонуклеазу [21]. Предложен метод для определения гепарина с алкоголь-дегидрогеназой и пируваткиназой [22].

Определение гиалуроновой кислоты. Гиалуроновая кислота бактерий количественно распадается до ненасыщенных дисахаридов. При этом освобождаются конечные группы *N*-ацетилглюкозоамина, которые могут быть определены реакцией Морган-Элсона. Экстинкцию измеряют при 585 *ммк* [23, 24].

Описан специфический ферментативный метод [25] определения гиалуроновой кислоты, который не зависит от степени полимеризации гиалуроновой кислоты [26].

Определение иминокислот. Модифицированным кислым нингидриновым методом Пиза определяли [27] содержание иминокислот в пробе до и после разрушения оксипролина ферментной системой. Модификация нингидринного метода заключается в уменьшении времени и повышении температуры инкубации с нингидрином до 30 мин. и 37°. Метод специфичен для оксипролина.

Для определения общего содержания оксипролина в моче ее предварительно гидролизовали.

Определение катепсина. Описан микрометод определения активности катепсина при помощи хроматографии на бумаге [28].

Определение ксилулозы. В обмене *L*-ксилулозы участвуют две дегидрогеназы пиридиннуклеотидов и ксилит как субстрат. На основании этого был разработан метод ферментативного микроопределения *D*- и *L*-ксилулоз [29]. Стереоспецифичность метода зависит от достаточного разделения обоих ферментов [30]. Ксилулозу можно определять колориметрически при помощи реакции цистеинкарбазола [31].

Описан метод определения *D*-ксилулозы с ДПН-ксилитдегидрогеназой [32]. Указанный метод похож на определение *L*-ксилулозы [33]. Участие *D*-ксилулозы и ее эстеров фосфорной кислоты в обмене веществ млекопитающих впервые стало известно недавно.

Определение L- и D-лизина. Предложено манометрическое определение *L*- и *D*-лизина при помощи бактериальной *L*-лизиноксидазы и рацемазы лизина [34].

Определение миоинозита. Предложен ферментативный метод определения миоинозита в микрограммовых количествах. Инозит-дегидрогеназа катализирует окисление миоинозита с ДПН [35]. Метод быстрый и простой, причем спектрофотометрически исследует восстановление НАД. Также описаны другие ферментативные методы для микроопределений миоинозита [36].

Определение мочевины. Описан [37] метод ферментативного и флуорометрического ультрамикроопределения мочевины, которая под действием уреазы превращается в NH^+_4, который в свою очередь реагирует с α-кетоглутаратом в присутствии дегидрогеназы глутаминовой кислоты и НАД-H_2. Последний превращается в НАД, который и флюоресцирует в сильно щелочной среде.

Определение D-рибозо-5-фосфата, D-рибулозо-5-фосфата, D-рибулозо-1,5-дифосфата и D-рибулозы. Описан ферментативный метод определения *D*-рибулозо-5-фосфата [38]. В присутствии изомеразы рибозо-5-фосфата и эпимеразы ксилулозо-5-фосфата рибозо-5-фосфат переходит в рибулозо-5-фосфат, а дальше в ксилулозо-5-фосфат.

Описан ферментативный метод определения *D*-рибулозы [39]. Этот метод отличается высокой специфичностью и позволяет проводить определение *D*-рибулозы в присутствии других сахаров [40].

Рибитдегидрогеназа катализирует в присутствии НАД обратимое окисление рибита в рибулозу. Предложены также и другие методы определения рибулозы [41]. *D*-рибулоза реагирует в присутствии рибулозокиназы и АТФ с образованием *D*-рибулозо-5-фосфата и АДФ.

Метод определения *D*-рибулозо-5-фосфата основан на образовании ксилулозо-5-фосфата в присутствии эпимеразы ксилулозо-5-фосфата [42].

Описан ферментативный метод определения *D*-рибулозо-1-5-дифосфата [43].

Определение неорганического фосфора. Описан [44] ферментативный метод определения неорганического фосфора. На различных этапах ферментативной реакции используются гликогенфосфорилаза, фосфоглюкомутаза и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа. Количество образовавшегося НАДФ-Н пропорционально количеству неорганического фосфора в исследуемом материале.

Определение сахара. Предложено [45] ферментативное определение сахара в крови in vitro и in vivo при помощи автоанализатора глюкозооксидазным методом с применением *о*-толуидина и окрашивающего реактива.

Определение D-сорбита. Описан ферментативный метод определения *D*-сорбита [46]. Сорбитдегидрогеназа катализирует обратимое окисление сорбита в *D*-фруктозу с ДПН как акцептором водорода.

Определение L-сорбозо-6-фосфата. Описан ферментативный метод определения *L*-сорбозо-6-фосфата [47].

Определение тирозина. Ферментативный метод количественного определения тирозина при помощи раствора тирозиназы описан Блайхом [48]. Исследуемую смесь облучают УФ-лампой и оставляют на 24 часа во влажной камере. При окислении тирозина образуется меланин, который окрашивает раствор, фотометрируют при 550 *ммк*.

Определение D-фруктозы. Для определения *D*-фруктозы предложен ферментативный метод, который считается быстрым и специфичным [49]. Наряду с фруктозой можно определять глюкозу, глюкозо-6-фосфат и фруктозо-6-фосфат.

Определение D-фруктозо-1,6-дифосфата. Описан ферментативный метод определения *D*-фруктозо-1,6-дифосфата. Его определяют со специфическим ферментом фруктозо-1,6-дифосфатазой [50; см. также 51].

Определение целлюлозы. Измеряют активность целлюлозы, пробу фильтруют, осадок окисляют и колориметрируют. Разница между опытной и контрольной пробой (без фермента) соответствует количеству фермента, гидролизирующего целлюлозу. Так можно определить от 0,2 до 1,2 *мг* целлюлозы [52].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Schmidt F. H.* a. *Schwartz M.* Klin. Wschr., 1966, N 10, 531.
2. *Данюков Ю. Г.*, *Мильман Л. С.* Вопросы мед. химии, 1966, № 12, 548.
3. *Thorn W.* et al. Bioch. Z., 1959, **331**, 545.
4. *Passonneau I.* V. et al. Anal. Biochem., 1967, **19**, 315.
5. *Johnson J.* a. Fusaro R. M. Anal. Biochem., 1966, **15**, 140.
6. *Pfleiderer G.* u. G r e i n L. Bioch. Z., 1957, 328, 499.
7. *Kondon C.* a. *O'Sullivan John B.* Public Health Repts. N. Y., 1966, 743.
8. *Saifer A.* a. *Gerstenfeld S.* J. Lab. Clin. Med., 1958, **51**, 448.
9. *Malmstedt H. V.* u. *Hicks G. P.* Anal. Chem., 1960, **32**, 394.
10. *Kohn I.* Lancet, 1957, **272**, 213.
11. *Hugget A.* St. G. a. *Nixon D. A.* Bioch. J., 1957, **66**, 12.
12. *Salomon L L.* a. *Johnson J. E.* Anal. Chem., 1959, **31**, 453.
13. *Dobrick L. A.* J. Biol. Chem., 1958, **231**, 403.
14. *Darrow R. A.* a. *Golowick S. P.* In: Colowick S. P. a. Kaplan N. O. Methods in Enzymology. Acad. Press. N. Y., 1962, Bd V, p. 226.
15. *Leder I. G.* J. Biol. Chem., 1957, **225**, 125.
16. *De Moss R. D.* In: Colowick S. P. a. Kaplan N. O. Methods in Enzymology. Acad. Press, N. Y., 1957, Bd III, 232.
17. *Sowerby* J. M. a. O t t a w a y J. H. Biochem. J., 1966, **99**, 246.
18. *Howard.* Bioch. J., 1957, **67**, 643.
19. *Halliwell G.* J. Gen. Microbiol., 1957, **17**, 166.
20. *Lorenz B.* et al. Z. ges. exptl Med., 1960, **133**, 144.
21. *Hobom G.* Dissertation. Univ. München, 1961.
22. *Horn H. D.* u. *Bruns K. H.* Verh. Dtsch. Ges. in Med., 1959, **65**, 604.
23. Kuhn R. Angew. Chem., 1957, 69, 23.
24. *Greiling* Z. Rheumaforsch., 1961, **20**, 298.
25. *Greiling.* Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem., 1957, **309**, 239.
26. *Greling H.* et al. Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem., 1960, **319**, 161.
27. *Rosano C.* Anal. Biochem., 1966, **9**, 341.
28. *Lebez D.* a. *Kopitar M. A.* Clin. chim. acta, 1967, **16**, 267.
29. *Hollmann S.* u. *Touster O.* J. Biol. Chem., 1957, 225, 87.
30. *Hickmann J.* a. *Ashwell O.* J. Biol. Chem., 1959, **234**, 758.
31. *Ashwell G.* a. *Hickmann J.* J. Biol. Chem., 1957, **226**, 65.
32. *Hickmann J.* a. *Ashwell G.* J. Biol. Chem., 1958, **232**, 737.
33. *Hickmann J.* a. *Ashwell G.* J. Biol. Chem., 1959, **234**, 758.
34. *Ichihara A.* et al. J. Biochem., 1960, **48**, 421.
35. *Weissbach A.* Bioch. bioph. Acta, 1958, **27**, 608.
36. *Kean E. L.* a. *Charalampous K. C.* Bioch. Bioph. Acta, 1959, **36**, 1.
37. *Roch-Ramel F.* a. *Peters G.* J. Physiol., 1966, **58**, 603.
38. *Cooper J.* et al. Arch. Bioch. Bioph., 1958, **74**, 306.
39. *Nordlic R. C.* a. *Fromm H. J.* J. Biol. Chem., 1959, **234**, 2523.
40. *Fromm H. J.* J. Biol. Chem., 1958, **233**, 1049.
41. *Fromm H. J.* J. Biol. Chem., 1959, **234**, 3097.
42. *Cooper J.* et al. Arch. Bioch. Bioph., 1958, **74**, 306.
43. *Racker E.* Arch. Bioch. Bioph., 1957, **69**, 300.
44. *Schulz D. W.* et al. Anal. Biochem., 1967, **19**, 300.
45. *Kawerau E. Z.* Clin. Chem., 1966, N 2, 224.
46. *Williams-Ashman H. G.* et al. Arch. Bioch. Bioph., 1957, **72**, 485.
47. *Couri D.* a. *Racker E.* Arch. Bioch. Bioph., 1959, **93**, 195.
48. *Blaich R.* Z. Naturforsch., 1966, **216**, 818.
49. *Schmidt F.* Klin. Wschr., 1961, № 39, 1944.
50. *Cooper J.* et al. Arch. Bioch. Bioph., 1958, **74**, 306.
51. *Racker E.* a. *Schroeder E. A.* Arch. Bioch. Bioph., 1958, **74**, 326.
52. *Halliwell G.* Bioch. J., 1958, **68**, 605.

ДРУГИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕРМЕНТОВ

Определение АТФ-фосфатазы (аденозинтрифосфатазы; КФ 3.6.1.3; 3.6.1.8). Предложен [171] прямой колориметрический метод для изучения АТФ-фосфатазы миозина. Активность фермента измеряют по убыли оптической плотности натриевой соли фенилазофенолсульфокислоты в незабуференном растворе.

Определение альдолазы (Кетозо-1-фосфатальдолаза; КФ 4.1.2.7).

Предложен модифицированный метод определения альдолазы, который заключается в колориметрическом определении количества фосфотриоз, образующихся при инкубации фермента с фруктозо-1,6-дифосфатом (ФДФ) с использованием цветной реакции с 2,4-динитрофенилтирозином [1].

Относительно спектрофотометрического метода определения альдолазы в сыворотке крови см. также [2].

Определение аденозиндезаминазы (КФ 3.5.4.4). Предложен [197] метод определения сывороточной аденозиндезаминазы, основанный на измерении количества освобождающегося NH_3 путем цветной индофеноловой реакции.

Определение адреналиноксидаз. Колориметрический микрометод определения активности адреналиноксидаз в кровяной плазме см. [3].

Определение амилазы (α-амилаза, КФ 3.2.1.1; β-амилаза, КФ 3.2.1.2). Модифицированный метод определения амилазы, единицей которой является количество фермента, гидролизующее 10 *мг* крахмала в течение 30 мин. до исчезновения реакции с йодом [4].

Определение амилазы (см. стр. 524). Модифицированное электрофоретическое определение амилазы предложили Шайфарт и Гётц [5].

Определение амилазы. Сакс и Тримбл [6] разработали модифицированный метод определения активности амилазы, который позволяет правильно определять патологически высокую активность амилазы в сыворотке и моче при панкреатите.

Определение амилазы. Предложен упрощенный метод определения амилазы сыворотки крови по измерению времени разрушения крахмала при 37° [7].

Определение амилазы. Предложен [8] сахарогенный метод определения амилазы в сыворотке. При ферментативном гидролизе крахмала образуются простые сахара, определение которых ведется в свободном от белков фильтрате восстановлением феррицианида в ферроцианид.

Предложен [9] быстрый метод определения α-амилазы в сыворотке крови и в моче в пробирках визуально.

Определение арилсульфатаз (КФ 3.1.6.1). Об определении активности арилсульфатаз А и В в моче человека см. [10].

Определение ангиотензиназы. Об определении ангиотензиназы см. [5, 11].

Определение изоферментов ангиотензиназы. Изоферменты ангиотензиназы см. [199].

Определение ангиотензиназы. Активность ангиотензиназы плазмы см. [198, 200].

Определение арилсульфатазы (КФ 3.1.6.1). Об определении арилсульфатазы см. [202, 203].

Определение аргиназы (КФ 3.5.3.1). Метод определения аргиназы см. [204].

Определение аргиназы. Предложен [9] усовершенствованный метод определения активности аргиназы в сыворотке крови с определением образовавшегося в конце реакции аммиака микродиффузионным методом Конвея.

Определение аргиназы. Модификацию метода определения аргиназы в сыворотке крови см. [12].

Определение изоферментов угольной ангидразы (карбонат-дегидратаза, карбоангидраза; КФ 4.2.1.1). Об изоферментах угольной ангидразы см. [206].

Определение ацетилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.7). Разработан [13] метод определения ацетилхолинэстеразы в крови, основанный на ферментативном гидролизе 1-C^{14}-ацетилхолина и последующем радиометрическом образовании C^{14}-AcOH.

Определение ацетилхолинэстеразы. Описан хроматографический метод определения активности сывороточной ацетилхолинэстеразы при помощи индикаторных бумажек [14].

Определение N-ацетил-β-глюкозаминидазы (ацетилглюкозаминидаза; КФ 3.2.1.30) и β-глюкуронидазы (КФ 3.2.1.31). Об определении N-ацетил-β-глюкозаминидазы и β-глюкуронидазы см. [207].

Описан флуорометрический метод определения N-ацетил β-глюкозаминидазы и β-галактозидазы в плазме крови при субстратах 4-метилумбеллиферилгликозидах. Освобождающийся при инкубации метилумбеллиферон определяли флуорометрически [208].

Относительно модификации метода определения гексокиназ в тканях см. [209] (КФ 2.7.1.1).

Определение аминотрипептидаз (КФ 3.4.1.3). Спектрофотометрический метод определения аминотрипептидазной

активности основан на следующем: как трипептид — триглицин, так и продукты его гидролиза — глицилглицин и глицин образуют окрашенные комплексы с медью, характеризующиеся максимумами поглощения при разных длинах волны, и по изменению поглощения судят об активности трипептидазы [15].

Определение γ-глютамилтранспептидазы. Колориметрическое определение активности γ-глютамилтранспептидазы в сыворотке крови и тканях человека при помощи синтетических субстратов предложили Орловский и др. [16].

Определение γ-глютамилтранспептидазы. Об определении активности γ-глютамилтранспептидазы в сыворотке крови и моче человека см. [17].

Определение γ-глютамилтранспептидазы. Для определения γ-глютамил-транспептидазы рекомендуют в качестве субстрата γ-глютамил-*n*-нитроанилид [214].

Определение γ-глютамилтранспептидазы. Колориметрический метод определения γ-глютамилтранспептидазы в сыворотке крови человека см. [215].

Определение γ-глютамилтранспептидазы. Предложен [216] новый метод определения γ-глютамилтранспептидазы, активность которой определяют инкубацией в течение 12 мин. при 37° 0,05 *мл* сыворотки крови с 0,45 *мл* р-γ-*L*-глютамилнафтиламида, забуференного глицилглицином до pH 7,4.

Определение α-галактозидазы (КФ 3.2.1.22). Для колориметрического определения α-галактозидазы авторы рекомендуют использовать 6-бром-2-нафтил->-нафтил->2-нафтил-α-*D*-галактопиранозид в качестве хромогенного вещества [217].

Определение гексокиназы (КФ 2.7.1.1). Предложен [218] метод определения гексокиназной активности спинномозговой жидкости по измерению убыли глюкозы после инкубации пробы в течение часа при 37° в системе, содержащей K^+, Mg^{2+}, F^-, а также глюкозу и АТФ.

Определение гиалуронидазы (гиалуронат-лиаза; КФ 4.2. 99.1). Описывается [23] метод определения сывороточной гиалуронидазы по количеству *N*-ацетилглюкозамина, образующегося при действии гиалуронидазы на гиалуроновую кислоту.

Определение гиалуронидазы. Предложен [24] флуориметрический метод определения гиалуронидазы и изучено ее ингибирование ионами меди, железа и цианидом. Метод основан на ферментативном превращении нефлюоресцирующего индоксилацетата в сильно флуоресцирующее соединение — белое индиго.

Определение гидроксилаз. Для определения гидроксилаз был предложен метод [25], использующий в качестве субстрата ацетанилид, оксипроизводные которого выделяют количественно и определяют фотометрическим путем.

Позднее был предложен [26] метод непосредственного определения продукта реакции, основанный на гидроксилировании кумарина с последующим флуориметрическим определением образую-

щегося α-оксикумарина (умбеллиферона). Метод был применен для определения гидроксилазной активности в микросомах печени.

Определение гистаминазы (диаминооксидазы; КФ 1.4.3.6). Предложен [210] спектрофотометрический микрометод для определения активности гистаминазы, основанный на применении ортодианизидина в качестве донора кислорода вместо индиго.

Определение гистидазы и урокиназы (гистидаза: гистидин-аммиак-лиаза; КФ 4.3.1.3). Об определении гистидазы и урокиназы см. [211].

Определение гуаниндезаминазы (КФ 3.5.4.3). Описан [27] колориметрический метод определения активности гуаниндезаминазы в сыворотке крови человека путем измерения количества отщепляемого NH_4^+ фенолгипохлоритным способом.

Определение гликопротеидов и серомукоидов. Об определении гликопротеидов и сермукоидов см. [221].

Определение β-глюкуронидазы (КФ 3.2.1.31). Описан [222] метод определения активности β-глюкуронидазы сыворотки и мочи колориметрически. Субстратом служит фенолфталеин моноглюкуронид; инкубация при 50° в течение 6 час.

Другой метод определения β-глюкуронидазы в сыворотке крови и моче основан [223] на использовании в качестве субстрата фенолфталеинглюкоронида.

Определение β-глюкуронидазы (КФ 3.2.1.31). Предложен [28] новый метод определения β-глюкуронидазы. Ферментная реакция протекает по схеме:

6-бром-2-нафтил-β-*D*-глюкопиранозид → 6-бром-2-нафтол + глюкуроновая кислота.

6-бром-нафтол определяют после предварительного превращения его в диазопигмент путем сопряжения со стабилизированным раствором диазониевой соли. Образующийся диазопигмент экстрагируют хлороформом и определяют количественно, пользуясь стандартной кривой, составленной по чистому 6-бромнафтолу.

Определение β-глюкозаминидазы. Описан [28] метод определения активности β-глюкозаминидазы в плазме, лейкоцитах и синовиальной жидкости с использованием синтетического субстрата *п*-нитрофенил-2-ацетиламино-2-диокси-β-*D*-глюкопиранозида.

Определение окисленного глютатиона. Окисленный глютатион в эритроцитах определяют количественно ферментативным методом и хроматографией на бумаге при помощи глютатионредуктазы. Метод основан на определении количества НАД-H_2, окисляющегося при инкубации с исследуемой пробой в присутствии глютатионредуктазы [30].

Определение глютатиона. О содержании глютатиона в эритроцитах см. [212].

Определение глюкокиназы (КФ 2.7.1.2). Об определении активности глюкокиназы печени см. [213].

Определение глюкозидазы. Предложен [31] электрохимический метод определения глюкозидазы, основанный на высвобождении цианида из субстрата амигдалина. Образующийся цианид определяется в спонтанно электролизированной клетке с использованием серебряно-платинового электрода (глюкозидаза КФ: α—3,2.1.20; β — 3,2.1.21).

Определение глюкозофосфоизомеразы (КФ 5.3.1.9). Описан [21] простой метод определения глюкозофосфоизомеразы.

Определение глюкозо-6-фосфатазы (КФ 3.1.3.9) Описан новый метод определения глюкозо-6-фосфатазной активности в печени [22].

Предложен [23] усовершенствованный метод определения глюкозо-6-фосфатазы в гомогенатах печени, основанный на специфическом определении образующейся глюкозы.

Определение глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.49). Предложено простое определение глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы капельным методом, пригодным для применения при массовых исследованиях [229].

Определение гуаназы (гуаниндезаминаза; КФ 3.5.4.3). Описан метод определения гуаназы в сыворотке или плазме крови по измерению количества гуанина, превращающегося в ксантин [216].

Определение дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата (КФ 1.1.1.49). Об определении дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата эритроцитов см. [230].

Определение дезаминазы адениловой кислоты. Описан метод [231] обнаружения активности дезаминазы адениловой кислоты в тканевых экстрактах, исключающий активности различных фосфатаз и аденозиндезаминазы. Определение ведется при помощи хроматографии на Дауэкс 1 × 8.

Определение дегидрогеназной активности. Метод электрофоретического определения дегидрогеназной активности см. [36].

Определение изоферментов дегидрогеназ. Предложен [37] метод определения изоферментов дегидрогеназ при помощи энзимэлектрофореза. Предлагается камера для микроэлектрофореза тканевых белков в геле агар-агара.

Определение дегидрогеназы 3β-ол-стероидов. Описан [38] быстрый и чувствительный метод определения активности дегидрогеназы 3β-ол-стероидов надпочечников.

Фермент определяется по количеству стероидов, поглощающих при 240 *ммк*, образующихся из дегидроэпиандростерона в стандартных условиях.

Определение дегидрогеназы глютаминовой кислоты. Об определении дегидрогеназы глютаминовой кислоты (КФ 1.4.1.4) см. [224].

Определение дегидрогеназы изолимонной кислоты (изоцитратдегидрогеназа; КФ 1.1.1.41). Колориметрический метод определения дегидрогеназы изолимонной кислоты в сыворотке крови см. [39].

Определение дегидрогеназы муравьиной кислоты. Метод определения дегидрогеназы муравьиной кислоты (формиатдегидрогеназы—КФ 1.2.1.2) см. [225].

Определение дегидрогеназы яблочной кислоты (малатдегидрогеназа; КФ 1.1.1.37). Описан [40] фотометрический метод определения дегидрогеназы яблочной кислоты в жидкостях организма.

Определение дегидрогеназы Δ-аминолевулиновой кислоты. Предложен простой метод определения активности дегидрогеназы Δ-аминолевулиновой кислоты в крови и печени [41].

Определение дегидрогеназы молочной кислоты (лактатдегидрогеназа; КФ 1.1.1.27). Фотометрический метод определения дегидрогеназы молочной кислоты в жидкостях организма см. [42].

Определение дегидрогеназы молочной кислоты. Предложено [43] электрофоретическое исследование дегидрогеназы молочной кислоты в крахмальном геле.

Определение дегидрогеназы α-оксимасляной кислоты. Сообщалось [44] о простом колориметрическом методе определения активности дегидрогеназы α-оксимасляной кислоты в сыворотке крови (оксибутиратдегидрогеназа — КФ 1.1.1.30).

Определение декарбоксилазы щавелевоуксусной кислоты. Метод определения декарбоксилазы щавелевоуксусной кислоты см. (оксалатоксидазы—КФ 1.2.3.4) [226].

Определение декарбоксилазы глутаминовой кислоты. Описан [227] метод определения активности декарбоксилазы глутаминовой кислоты при помощи C^{14} глутаминовой кислоты.

Определение α-оксибутиратдегидрогеназы [228]. Обнаружена активность α-оксибутиратдегидрогеназы в артериальной ткани при атеросклерозе.

Определение глютаматдегидрогеназы (КФ 1.4.1.2). Кирк [229] изучал активность глутаматдегидрогеназы и глютатионредуктазы у лиц различного возраста.

Определение НАД-H_2-диафораз. Метод определения НАД-H_2-диафораз см. [230].

Определение диафораз (дегидрогеназа восстановленного НАДФ; КФ 1.6.99.2). Предложен [231] метод определения диафоразной активности, основанный на визуальном определении времени обесцвечивания 2,6-дихлорфенолиндофенола.

Определение изоцитратдегидрогеназы (КФ 1.1.1.41). Активность изоцитратдегидрогеназы определяли в гомогенатах эритроцитов [232].

Определение изоцитратдегидрогеназы. Предложен [233] метод определения активности изоцитратдегидрогеназы в спинномозговой жидкости у детей.

Определение диастазы. Экспресс-определение диастазы (амилазы) см. [45].

Предложен [46] быстрый метод определения диастазы в моче.

О модифицированном методе определения диастазы в сыворотке крови и пробе на простигмин см. [47].

Определение желатиназы. Метод определения желатиназы см. [48].

Определение катепсина (КФ 3.4.4.9). Описан [234] количественный микрометод определения активности катепсина. Продукты гидролиза разделяли хроматографированием на бумаге и пятна денситометрировались.

Определение каталазы (КФ 1.11.1.6). Метод быстрого определения каталазы в образцах крови и тканей при помощи манометра Ван-Слайка см. [235].

Предложен [236] титанилсульфатный метод определения каталазы в крови, сыворотке и моче, основанный на определении количества нерасщепленной H_2O_2 при помощи титанилсульфата и последующим фотометрированием.

Определение карбоангидразы (КФ 4.2.1.1). Разработан сравнительно простой метод определения активности карбоангидразы в биологических жидкостях и тканях [237].

О модификации метода определения карбоксипептидазы см. 238 (КФ 3.4.2.1).

Определение коллагеназы. Недавно опубликован [49] метод количественного определения активности коллагеназы, основанный на измерении скорости отщепления от синтетического карбобензоксигексапептида, карбобензокси-глиц.-прол.-глиц-глиц.-прол.-ал., инкубированного в цитратном буфере, трипептида глиц.-прол.-ал. О количестве отщепленного трипептида судят на основании колориметрического определения его при помощи реакции с нингидрином (коллагеназа: клостридиопептидаза; КФ 3.4.4.19).

Определение коагулазы. Описан [50] быстрый метод нефелометрического определения активности коагулазы по увеличению светорассеяния в результате свертывания фибриногена под влиянием коагулазы.

Определение кокарбоксилазы. Предложено [51] количественное определение кокарбоксилазы при помощи ионообменной хроматографии.

Флуориметрическое определение кокарбоксилазы см. [52].

Определение креатинкиназы (КФ 2.7.3.2). Описан [53] чувствительный ферментативный фотометрический метод определения креатинкиназы в сыворотке крови. Метод основан на сочетании креатинкиназной реакции с гексокиназной и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной реакциями и определении количества образующегося в последней реакции НАДФ-H_2.

Определение изоферментов креатинфосфокиназы [239] (креатинкиназа; КФ 2.7.3.2). Описан метод флюоресцентного обнаружения изоферментов креатинфосфокиназы после тонкослойного электрофореза на агаровом геле.

Определение креатинфосфокиназы (см. креатинкиназа). Предложен [54] метод колориметрического определения креатинфосфокиназы, который основан на взаимодействии креатина и АТФ, при котором образуется пируват. Активность креатинфосфокиназы выражают в микромолях пирувата, образовавшегося в течение 30 мин. при 37° в 1 *мл* сыворотки.

Определение креатинфосфокиназы в сыворотке крови по выделению креатина и сравнению со стандартом см. [55].

Определение лактикодегидрогеназы (лактатдегидрогеназа; КФ 1.1.1.27). Флуорометрический метод определения лактикодегидрогеназы в сыворотке см. [56].

Описана автоматическая система для определения лактатдегидрогеназы в моче [57].

Предложено [58] использовать автоматический спектрофотометрический метод определения скорости реакции окисления лактата в присутствии лактатдегидрогеназы и НАД по измерению поглощения света образующимся НАД-H_2 (для определения лактикодегидрогеназы).

В другой работе [59] описано полностью автоматизированное определение лактатдегидрогеназы в сыворотке крови с использованием солей тетразолия в качестве хромогенного индикатора и феназинметасульфата, служащего промежуточным переносчиком электронов.

Предложен [60] спектрофотометрический метод определения активности специфической сердечной лактатдегидрогеназы, основанный на торможении ее мочевиной.

Кинетический метод анализа активности изоферментов лактатдегидрогеназы в плазме и тканях см. [61].

Метод определения активности лактатдегидрогеназы в сыворотке крови см. [62].

Сообщалось [63] об автоматическом спектрофотометрическом методе определения термостабильного изофермента *L*-лактатдегидрогеназы и оксибутиратдегидрогеназы, а также общей лактикодегидрогеназы в сыворотке крови. Определение основано на инкубации сывороток с пируватом натрия и НАДФ-H_2, для определения же оксибутиратдегидрогеназы субстратом используют α-кетобутират.

Метод электрофореза в агаровом геле с конвекционным охлаждением, пригодный для разделения и выявления изоферментов лактикодегидрогеназы сыворотки и других биологических жидкостей, а также тканевых экстрактов рассматривается в одной из публикаций [64].

Определение лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27). Метод определения лактатдегидрогеназы см. [240—245].

Определение изоферментов лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27). Предложен [246] модифицированный метод определения изоферментов лактатдегидрогеназы. Упрощена техника электрофореза и ферментативной реакции, уменьшен расход дорогостоящих реактивов и т. п.

Описаны методы количественного определения изоферментов лактатдегидрогеназы в сыворотке крови [247—260].

Определение лецитиназы. Предложен [65] метод определения активности лецитиназы А в сыворотке крови и других жидкостях организма. (Лецитиназа: фосфолипаза; КФ 3.1.1.4).

Определение лейцинаминопептидазы (3.4.1.1). Методы определения лейцинаминопептидазы см. [261—267].

Определение липазы (КФ3.1.1.3). Об определении липаз см. [268—270].

Определение липазы (КФ 3.1.1.3). Описан метод количественного определения активности липазы в сыворотке крови; в качестве субстрата применяли эмульсию оливкового масла в трис-буфере [66].

Известен [67] метод определения активности сывороточной липазы титрованием NaOH жирных кислот, отщепляющихся при гидролизе эмульсии оливкового масла липазой сыворотки.

Усовершенствованный метод определения липопротеидной липазы, состоящий в применении нормальной липемической сыворотки как субстрата вместо искусственной смеси липидов — см. [68].

Опубликован [69] метод определения панкреатической липазы в сыворотке крови; в качестве субстрата применяли эмульсию прованского масла с последующим титрованием жирных кислот едким натром.

Предложен [70] метод определения активности сывороточной липазы с применением одночасового гидролиза. Активность липазы определялась по количеству *мкмолей* жирных кислот в 1 *мл* сыворотки за 1 час.

Метод определения активности липазы в дуоденальном соке человека с использованием в качестве субстрата коммерческих препаратов оливкового масла см. [71].

Новый метод определения липазы при помощи лабораторного смесителя нового типа см. [72].

Другой метод определения липазы в дозированных образцах рассматривается в работе [73].

Определение фосфолипазы А (КФ 3.1.1.4). Предложен [74] простой и быстрый метод определения активности фосфолипазы А. В качестве субстрата использован свежий яичный желток, который гидролизуется в 10—20 раз быстрее чистого лецитина.

Описан [75] быстрый турбидиметрический метод определения активности фосфолипазы А, основанный на использовании в качестве субстрата водной эмульсии лецитина, мутность которой в ходе

реакции, катализируемой фосфорилазой А, убывает вследствие просветляющего действия образующегося лизолецитина.

Определение панкреатической липазы (КФ 3.1.1.3.). Описана [271] модификация метода определения активности липазы, основанного на экстракции бензолом жирных кислот, с последующим колориметрическим определением их в виде солей меди.

Определение липопротеиновой липазы (КФ 3.1.1.3). Предложен [272] быстрый и хорошо воспроизводимый метод определения активности липопротеиновой липазы плазмы с использованием интралипидов (80е) в качестве субстрата.

Определение амидрасщепляющих ферментов. Определение лейцинамидрасщепляющих ферментов см. [273].

Определение ксантиноксидазы (КФ 1.2.3.2). Метод определения активности ксантиноксидазы см. [274].

Определение медь-оксидазы. Об определении медь-оксидазы см. [275].

Определение глицерофосфатоксидазы. Метод определения глицерофосфатоксидазной активности лейкоцитов см. [276].

Определение аминоксидазы (КФ 1.4.3.4). Предложен [277] спектрофотометрический метод определения аминооксидазной активности в сыворотке крови крупного рогатого скота.

Определение моноаминооксидазы (КФ 1.4.3.4). Описан [278] чувствительный метод определения моноаминооксидазы, основанный на определении количества C^{14}-индолуксусной кислоты, образующейся под действием моноаминооксидазы из 2-C^{14}-триптамина.

Был предложен [279] спектрофотометрический метод определения активности моноаминооксидазы в гомогенатах печени. Метод основан на использовании в качестве субстрата *м*-нитро-*н*-оксибензиламина, превращающегося под действием моноаминооксидазы в *м*-нитро-*п*-оксибензальдегид.

Те же авторы предложили метод определения активности моноаминооксидазы в гомогенатах мозга, основанный на измерении поглощения при 450 *ммк* вещества, образующегося из *п*-нитрофенилэтиламина при действии на него моноаминооксидазы [280].

Определение диаминоксидазы (гистаминаза; КФ 1.4.3.6). Определение активности диаминоксидазы у детей, страдающих болезнью Боткина, см. [281].

Определение малатдекарбоксилазы (см. малатдегидрогеназа). Предложен [76] метод определения малатдекарбоксилазы в печени, которое производят инкубированием нескольких десятых *мг* гомогената ткани с *d*-яблочной кислотой, $MnCl_2$ и НАДФ. Количество восстановленного НАДФ-H_2 устанавливают измерением интенсивности флуоресценции раствора при 340 *ммк*.

Определение моноаминооксидазы (КФ 1.4.3.4). Описан [77] простой метод определения активности моноамино-

оксидазы и оксидазы *D*-аминокислот по измерению количества аммиака; в качестве субстрата применяли серотонинкреатининсульфат.

Колориметрический метод измерения активности моноаминооксидазы см. [78].

Определение мутаротазы (альдозо-1-эпимераза, альдозомутаротаза; КФ 5.1.3.3). Чувствительное поляриметрическое определение мутаротазы с использованием рацемических смесей сахара см. [79].

Определение нуклеотидпирофосфорилаз. Предложен [80] унифицированный метод определения нуклеотидпирофосфорилаз, основанный на измерении скорости потребления субстрата в процессе ферментативной реакции.

Определение 5′-нуклеотидазы (КФ 3.1.3.5). Описан [81] автоматический метод определения 5′-нуклеотидазы при помощи автоанализатора Техникон. Активность фермента определяется по скорости гидролиза аденозин-5-монофосфата при pH 7,4 в присутствии 0,01 *M* никеля, активизирующего фермент.

Предложен [82] оптический ферментативный метод определения 5′-нуклеотидазы (5-рибонуклеотид-фосфогидролаза КФ 3.1.3.5) по количеству аденозина, отщепленного от АМФ после добавления аденозиндезаминазы в избытке.

Определение нуклеозид-5-ди- и трифосфатаз (нуклеозиддифосфатаза; КФ 3.6.1.6). Предлагается [83] упрощенный ферментативный метод для получения нуклеозид-5-ди- и трифосфатов из печени крысы. Нуклеотиды были изолированы методом ионообменного хроматографирования. В качестве элюата был использован триэтиламинбикарбонатный летучий буфер.

Определение окситоциназы. В публикации [84] приведен биохимический метод определения окситоциназы и рассмотрено его клиническое значение (ср. КФ 3.4.1.2 и 3.4.1.3).

Описан [85, 86] полярографический метод определения окситоциназы в сыворотке крови. В качестве субстрата использовали питуитрин.

Известен [87] простой метод определения окситоциназы, заключающийся в том, что сыворотку инкубируют с δ-бензил-*L*-цистин-β-нафтиламидом и определяют освобожденный β-нафтиламин флуорометрически или колориметрически.

Метод определения активности сывороточной окситоциназы (*L*-цистин-аминопептидазы), основанный на использовании в качестве субстрата *L*-цистин-ди-β-нафтиламида и определении образующегося нафтиламина, см. [88].

Определение оксидаз (оксидаза *D*-аминокислот; КФ 1.4.3.3; *L*-аминокислот, 1.4.3.2). Колориметрическое определение активности оксидазы гликолевой кислоты и редуктазы глиоксалевой кислоты (КФ 1.1.1.26) рассмотрено в работе [89].

Предложен [90] метод определения активности адреналиноксидаз в кровяной плазме.

Определение лейцинаминопептидазы (КФ 3.4.1.1), γ-глютамилпептидазы и γ-глютамилтранспептидазы. Для определения лейцинаминопептидазной активности спинномозговая жидкость (СМЖ) инкубируется в течение 24 час. с лейцин-β-нафтиламидом, pH 7,2, в присутствии ионов Co^{++}; отщепляющийся при этом β-нафтиламид с Fast Red R дает красную окраску.

γ-глютамилпептидазная активность определяется инкубированием СМЖ с γ-глютамил-α-нафтиламидом при pH 9,0 без добавления активатора и затем высвобожденный α-нафтиламин определяется при помощи диазотирования. Активность γ-глютамилтранспептидазы определяется этим же путем, но в присутствии глицилглицина [91].

Предложен [92] более чувствительный, быстрый, легкий и экономный метод определения γ-глютамилтранспептидазы, в котором глицилглицин служит субстратом, активатором и буфером.

Определение протеолитической активности.

Предложен метод определения протеолитической активности поджелудочного сока, принцип которого заключается в учете остатка негидролизованного казеина после его инкубации с исследуемой биологической жидкостью [282].

Чувствительный метод количественного определения протеолитической активности трипсина в сыворотке крови с использованием в качестве субстрата протамина см. [283].

Определение пероксидазы (КФ 1.11.1.7). Предложен [284] метод раздельного определения активности истинных пероксидаз, основанный на фотометрическом определении скорости образования бензидинового синего.

Отмечается понижение содержания пероксидазы в лейкоцитах у детей, страдающий гидроцефалией [285].

Определение пептидаз. Предложен [112] метод определения пептидаз, основанный на способности пептидов сильно поглощать свет в области 220—230 *ммк* в отличие от аминокислот, их составляющих, которые поглощают в этой области спектра крайне слабо.

Определение протеолитической активности. Недавно был разработан [93] метод определения общей протеолитической или эстеразной активности трипсина и химотрипсина поджелудочной железы, панкреатического сока и содержимого кишечника.

Следует учитывать возможность влияния примеси рибонуклеазы, встречающейся во всех коммерческих казеинах, употребляемых в методах Ансона или Куница для определения протеолитической активности. Рибонуклеазную активность казеина можно предварительно уничтожить [94].

Определение протеолитической активности в биологических средах см. [95].

О микрометоде определения протеолитической активности см. [96].

Предложен метод определения протеолитической активности методом адсорбционной полярографии [97].

Описан [98] быстрый метод количественного определения протеолитических ферментов.

Метод прямого обнаружения протеолитических ферментов после электрофореза в геле агара рассматривается в одной из работ [99].

О фотометрическом определении протеолитической активности сыворотки крови см. [100].

Определение пирокатехиноксидазы. Об определении пирокатехиноксидазной активности см. [101].

Определение пролингидроксилазы. Описан [102] быстрый чувствительный метод определения активности пролингидроксилазы, основанный на определении $H^3{}_2O$, которая образуется, когда 3,4-H^3-*L*-пролин в специально приготовленном субстрате превращается в 3-H^3-*L*-оксипролин.

Определение пировиноградной и молочной кислот. Модифицирован [103] ферментативный метод определения концентрации пировиноградной и молочной кислот в крови.

Определение пируваткиназы (КФ 2.7.1.40). Предложен [104] новый спектрофотометрический метод определения пируваткиназы. Ферментативное трансфосфорилирование прослеживается по исчезновению фосфоэнолпирувата при 230 *ммк*.

Определение пируваткиназы (КФ 2.7.1.40). Об определении активности пируваткиназы см. [286].

Относительно модификации метода определения протеаз в тканях см. [287].

Определение полифенолоксидазы (*о*-дифенолоксидаза; КФ 1.10.3.1). Определение активности полифенолоксидазы и поляриметрический метод определения фенолазы см. [105].

Определение рибонуклеаз (КФ 2.7.7.16). Спектрофотометрическое определение активности ринонуклеазы поджелудочной железы крупного рогатого скота при помощи цитидин-2′3′-фосфата см. [106].

Об определении активности рибонуклеазы см. также [107].

Предложен [108] микрометод для определения активности рибонуклеазы.

Другой метод определения рибонуклеазы с использованием синтетических субстратов описан в работе [109].

Спектрофотометрический метод определения рибонуклеазы см. [110].

Турбидиметрический метод определения рибонуклеазы см. [111].

Определение нейтральной рибонуклеазы диффузионным методом см. в работе [112].

При определении рибонуклеазы (КФ 2.7.7.16) субстрат РНК не дает стабильных результатов. Авторы рекомендуют синтетический

нуклеотид с постоянными свойствами. Используют как субстрат Ва-цитидин 2′, 3′-фосфат; это дает возможность заканчивать определение спектрофотометрически [113].

Определение РНК-азы по конечным продуктам распада полицитидиловой кислоты описано в [114].

Определение дезоксирибонуклеазы (КФ 3.1.4.5). Описан [115] турбидиметрический метод определения активности дезоксирибонуклеазы, в котором для осаждения ДНК используется антибиотик неомицинсульфат.

Определение трансаминаз (аминофераз) — см. аспартат- и аланинаминотрансферазы. Предлагается [116] простой и чувствительный метод определения аминоферазной активности при использовании α-кетоглутарата в качестве акцептора NH_2-групп. Метод не зависит от pH реакционной смеси.

Метод (микро) определения трансаминазной активности в сыворотке человека см. [117].

Простой метод определения аминофераз сыворотки крови с использованием фотометра Пульфриха указан в [118].

Предложен [119] метод определения трансаминаз (глутамикоаспарагиновой и глутамикоаланиновой аминотрансфераз) в сыворотке крови.

Исследование колориметрических методов определения глутамикощавелевоуксусной аминоферазы в сыворотке крови см. [120].

Определение аминоферазы глутамикощавелевоуксусной кислоты; колориметрический метод, основанный на принципе Рейтмана и Франкеля см. [121].

Улучшенные спектрофотометрические методы определения аминофераз глутаминовой щавелевоуксусной и глутаминовой пировиноградной кислот и дегидрогеназы молочной кислоты см. [122].

Колориметрический метод определения в сыворотке крови активности глутамикощавелевоуксусной и глутамикопировиноградной аминофераз рассмотрен в сообщении [123].

Описан флуорометрический метод определения активности глутамикощавелевоуксусной трансаминазы в сыворотке [124].

Предложен [125] новый чувствительный автоматический метод определения глутамикощавелевоуксусной трансаминазы в сыворотке. Ферментативно высвобожденная щавелевоуксусная кислота связывается с диазосолью пунцового цвета с образованием окрашенного раствора, поглотительная способность которого определяется при 445 *ммк*.

Ферментативный метод измерения активности γ-аминобутират-α-оксалоглутараттрансаминазы см. [126].

Определение глютамикоаспарагиновой трансаминазы (аспартат — аминотрансфераза; КФ 2.6.1.1). Метод определения АСТ для клинических целей см. [291].

Об определении глютамикоаспарагиновой трансаминазы см. также [292—301].

Определение тирозингидроксилазы. Быстрый простой анализ тирозингидроксилазной активности при помощи радиоизотопов см. [127].

Определение трипептидаз. Определение активности трипептидаз см. [128].

Определение тиреоглобулинпротеазы, цитохром-*c*-редуктазы (дегидрогеназа восстановленного НАД; КФ 1.6.99.3). Об определении тиреоглобулинпротеазы, цитохром-*c*-редуктазы и щелочной фосфатазы см. [288].

Определение γ-глютамилтранспептидазы. Описан [289] новый метод определения активности сывороточной γ-глютамилтранспептидазы, основанный на использовании в качестве субстрата бесцветного γ-глютамил-*п*-нитранилина по поглощению при 410 *ммк*.

Определение дипептидаз. Описан [290] быстрый и простой способ определения активности дипептидаз, основанный на исчезновении поглощения пептидной связи при 220 *ммк* в результате гидролиза.

Определение трипсина и его ингибитора (КФ 3.4.4.4). Показана [129] возможность использования полярографического метода для количественного определения трипсина и его ингибитора. Метод легко применим для определения трипсина в дуоденальном содержимом и для изучения протеолиза.

Определение миокиназы (аденилаткиназа; КФ 2.7. 4.3). Об определении активности миокиназы (аденилаткиназы) в сыворотке крови см. [304].

Определение орнитинкарбамилтрансферазы (КФ 2.1.3.3.). Описан [305] метод определения орнитинкарбамилтрансферазы, основанный на том, что этот фермент в присутствии арсената катализирует расщепление цитруллина с выделением CO_2, количество которого пропорционально активности фермента. Предложен [306] также и другой метод определения орнитинкарбамилтрансферазы. Описанный метод обладает более высокой чувствительностью чем метод, предложенный ранее теми же авторами.

Определение гликоген-1,4-глюкозилтрансферазы. Метод определения гликоген-1,4-глюкозилтрансферазы в эритроцитах см. [307].

Определение галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы (КФ 2.7.7.10). Метод определения галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы приведен в [308].

Предложен [309] улучшенный метод определения активности галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы эритроцитов и лейкоцитов, основанный на измерении утилизации УДФГ, остаток которой определяют спектрофотометрическим методом с УДФГ- дегидрогеназой и НАД.

Определение аспартатаминотрансферазы [КФ 2.6.1.1]. Предложен [310] метод определения активности аспартатаминотрансферазы в гомогенатах головного мозга.

Определение уридиндифосфоглюкозоглюкозилтрансферазы (КФ 2.4.1.14). Метод определения уридиндифосфоглюкозоглюкозилтрансферазы см. [311].

Определение D-глюкозо-6-фосфотрансферазы (КФ 2.7.1.41). Определение *D*-глюкозо-6-фосфотрансферазы см. [312].

Определение L-аспартат 2-оксоглутарат-аминотрансферазы. Предложен [130] метод определения активности *L*-аспартат-2-оксоглутаратаминотрансферазы, основанный на том, что пировиноградная кислота с ванилином в сильно щелочной среде дает желтую окраску, интенсивность которой измеряется на спектрофотометре при 470 *ммк*.

Определение глутаматоксалацетатаминотрансферазы (см. аспартатаминотрансфераза). Предложен [131] метод определения активности глутаматоксалацетатаминотрансферазы путем проведения следующих последовательных реакций: 1) переаминирование аспарагиновой кислоты с α-кетоглутаровой; 2) окисление образовавшегося глутамата в присутствии НАД глутаматдегидрогеназой; 3) восстановление образовавшимся НАД-H_2 окисленной формы 2,6-дихлорфенолиндофенола в присутствии феназинметасульфата.

Описан [132] также модифицированный метод Бабсона для определения активности глутаматоксалацетатаминотрансферазы с хлоридом 6-бензамидо-4-метокси-*м*-толуидиндиазония, дающим специфическое окрашивание со щавелевоуксусной кислотой.

Определение билирубинглюкуронилтрансферазы. Микрометод определения активности билирубинглюкуронилтрансферазы в пунктатах печени см. [133].

Определение АЛТ, ЛДГ и глутаматдегидрогеназы (аланинаминотрансфераза; КФ 2.6.1.2; лактатдегидрогеназа; КФ 1.1.1.27; глутаматдегидрогеназа; КФ 1.4.1.2). Об определении АЛТ, ЛДГ и глутаматдегидрогеназы см. [301].

Определение орнитинкарбамилтрансферазы (КФ 2.1.3.3). Метод определения орнитинкарбамилтрансферазы см. [302].

Новый метод определения в сыворотке крови орнитинкарбамилтрансферазы см. [303].

Определение галактозо-1-фосфатуридилилтрансферазы (КФ 2.7.7.10). Предложен [134] усовершенствованный метод определения активности галактозо-1-фосфатуридилилтранферазы эритроцитов, основанный на измерении убыли УДФ-глюкозы в ходе реакции, катализируемой галактозо-1-фосфатуридилилтрансферазой.

Определение орнитинкарбамилтрансферазы (КФ 2.1.3.3). Описан [135] метод определения сывороточной орнитинкарбамилтрансферазы, основанный на спектрофотометрическом определении образующегося цитруллина по реакции с диацетилмонооксиамином и феназоном после расщепления мочевины уреазой.

Предложен также [136] метод определения сывороточной орнитинкарбамоилтрансферазы по измерению количества NH_3, образующегося при арсенолизе цитруллина.

Определение тиогалактозидтрансацетилазы. Спектрофотометрическое определение тиогалактозидтрансацетилазы см. [137].

Определение тимидилатсинтетазы. Описана [138] модификация метода количественного определения тимидилатсинтетазы, основанная на выделении в виде протона атома трития из дезоксиуридиловой кислоты при образовании тимидиловой кислоты.

Определение трансглюкуронидазы (КФ 3.2.1.31). Метод определения трансглюкуронидазной активности см. [313].

Определение тирозингидроксилазы. Об определении тирозингидроксилазы см. [314].

Определение γ-глютамилтранспептидазы. Метод определения γ-глютамилтранспептидазы см. [315].

Определение уроканиназы. Спектрофотометрическое и колориметрическое определение уроканиназы в крови см. [139].

Определение уропепсина. Модифицирован [140] метод Сиркуса для определения уропепсина. Вместо сыворотки используют сухую дефибринированную кровь, количество тирозина определяется колориметрически.

Определение уропепсиногена. Предложен [141] модифицированный метод определения уропепсиногена. Принцип метода состоит в осаждении пепсином казеина молока. В модификации взят молочный порошок, полученный из одного источника, так чтобы содержание белка было постоянным.

О методике микрохимического исследования активности некоторых ферментов в пунктатах печени см. [142].

Методы определения и фракционирования ферментов см. [143].

Спектрофотометрические методы исследования дыхательных ферментов в живых клетках описаны в [144]; автоматическое измерение ферментативной активности см. [145].

Определение фосфатаз (см. фосфатаза кислая и щелочная). Об определении фосфатазы плаценты см. [316].

Определение кислой фосфатазы (КФ 3.1.3.2). Автоматический метод определения кислой фосфатазы см. [317].

Применение фенилфосфата и α-нафтилфосфата в качестве субстрата для кислой фосфатазы сыворотки см. [318].

Определение щелочной фосфатазы (КФ 3.1.3.1). Характеристику щелочной фосфатазы сыворотки и тканей см. [319]. Метод определения щелочной фосфатазы, в котором в качестве субстрата служит фенолфталеинмонофосфат, см. [320].

Об определении щелочной фосфатазы кишечного происхождения в сыворотке см. [321].

Автоматический метод определения щелочной фосфатазы и фосфора см. [322].

Метод определения щелочной фосфатазы лейкоцитов см. [323].

Об определении автоматическим методом щелочной фосфатазы см. [324].

Об определении щелочной фосфатазы см. [325, 326].

Определение кислой фосфатазы (КФ 3.1.3.2). Предложен [146] упрощенный модифицированный метод определения в сыворотке крови кислой фосфатазы предстательной железы.

Определение кислых фосфатаз сыворотки крови по методу Кинга и Джагатхисана описано в [147].

Предложен [148] спектрофотометрический способ определения активности кислой фосфатазы в сыворотке крови, основанный на использовании в качестве субстрата α-нафтилфосфата и флуорометрического определения количества α-нафтола, образующегося в процессе ферментативного гидролиза.

Описан [149] упрощенный клинический метод определения простатической кислой фосфатазы в сыворотке крови, основанный на использовании α-нафтилфосфата в качестве специфического субстрата.

Судгоф и другие [150] предложили модификацию метода Горкома для определения кислой фосфатазы простатического происхождения в сыворотке крови. В качестве субстрата используют α-нафтилфосфат.

Предложен [151] усовершенствованный метод определения кислой фосфатазы, основанный на использовании в качестве субстрата α-нафтилфосфата.

Определение кислой фосфатазы (КФ 3.1.3.2). Описан [152] метод определения активности сывороточной кислой фосфатазы при субстрате α-нафтилфосфат (0,1 *М* цитратный буфер, pH 5,2), основанный на колориметрическом определении выделяющегося α-нафтола при помощи реакции Эммерсона.

Описан [153] простой метод определения активности кислой фосфатазы в тканевых гомогенатах с использованием в качестве субстрата α-нафтилфосфата.

Определение щелочной фосфатазы (3.1.3.1). Предложен быстрый ультрамикрометод определения щелочной фосфатазы [154].

Был предложен [155] модифицированный метод автоматического определения щелочной фосфатазы, основанный на определении вначале неорганического фосфора по реакции с молибденовой кислотой и аминонафтолом, затем общего фосфора. Активность фермента выражают по количеству выделившегося неорганического фосфора.

Описан автоматический метод определения щелочной фосфатазы с использованием *п*-нитрофенолфосфата при помощи автоанализатора Техникон [156].

Приводится [157] метод определения активности щелочной фосфатазы, основанный на прямом спектрофотометрическом определе-

нии фенолятиона, освобождающегося при ферментативном расщеплении фенилфосфата.

Предложен [158] микрометод определения в одной пробе крови активности щелочной фосфатазы и содержание органического фосфора.

На основе непрерывного электрофореза предложен метод определения изозимов щелочной фосфатазы [159].

Описан [160] новый метод (колориметрический) определения щелочной фосфатазы, в котором в качестве субстрата используется индоксилфосфат. Образующийся индоксил окисляется кислородом воздуха в синее индиго, интенсивность которого фотометрируется.

Оптический метод определения щелочной фосфатазы в сыворотке крови см. [161].

Простой метод ориентировочного определения щелочной фосфатазы сыворотки крови см. [162].

Предложен быстрый неавтоматический метод определения [163] щелочной фосфатазы сыворотки крови в приборе «Аутоаналяйзер».

В другом методе [164] определения щелочной фосфатазы в качестве субстрата использован *n*-нитрофенилфосфат. Буфером служит $NH_4OH—NH_4Cl$. Оптимальный pH 9,5—10,5, температура инкубации 37°, продолжительность 30 мин.

Автоматизирован [105] метод Бабсона и других для определения сывороточной щелочной фосфатазы. Метод основан на колориметрическом определении фенолфталеина, образовавшегося в результате гидролиза монофосфата фенолфталеина.

Описан [166] метод автоматического определения щелочной фосфатазы сыворотки с фенолфталеинмонофосфатом в качестве субстрата.

Автоматический микрометод определения активности сывороточной щелочной фосфатазы см. [167].

Описан [168] метод определения активности сывороточной щелочной фосфатазы, основанный на изменении оптической плотности при 400—405 *ммк*, связанном с появлением окрашенного *n*-нитрофенолята при ферментативном гидролизе *n*-нитрофенилфосфата.

Описан [169] упрощенный метод определения сывороточной щелочной фосфатазы, использующий в качестве субстрата *n*-нитрофенилфосфат в буфере 2-амино-2-метил-1-пропанола.

Предложен [170] также метод определения активности щелочной фосфатазы сыворотки крови путем автоматической регистрации спектрофотометрическим способом (при 405 *ммк*) количества выделяющегося *n*-нитрофенола при ферментативном гидролизе *n*-нитрофенилфосфата.

Определение фибриназы. Описан [172] микрометод определения активности фибриназы, учитывая время растворения сгустка, зависящее от активности фибриназы.

Определение 5-фосфорибозилпирофосфата. Метод [173] является модификацией метода Либермана и др. Он основан на количественном превращении оротовой кислоты и 5-фосфорибозилпирофосфата в 5′-УМФ, которое катализируется оротидин-5-монофосфатпирофосфорилазой и оротидин-5-монофосфат-

декарбоксилазой. В качестве ферментов используют экстракт из мутантного штамма Micrococcus glutamicus.

Определение фенилаланингидроксилазы (фенилаланин-4-гидроксилаза; КФ 1.14.3.1). Разработан [174] быстрый и чувствительный радиоизотопный метод определения фенилаланингидроксилазы с использованием *p*-тритио-*L*-фенилаланина в качестве субстрата.

Определение фенэтаноламин-*N*-метилтрансферазы. Предложен [175] улучшенный метод определения фенэтаноламин-*N*-метилтрансферазной активности с норадреналином в качестве субстрата. Принцип метода состоит в селективном осаждении после инкубации избытка фермента в форме рейнеката и измерении количества C^{14}-адреналина, остающегося в надосадочной жидкости.

Определение фосфогексоизомеразы (глюкозофосфатизомераза; КФ 5.3.1.9). Предложен [176] модифицированный метод определения фосфогексоизомеразы, основанный на образовании Ф-6-Ф при воздействии сыворотки на субстрат в течение часа в приведенных в методике условиях.

О методике определения активности сывороточной фосфогексоизомеразы см. [177].

Определение фосфогексоизомеразы (глюкозофосфатизомераза; КФ 5.3.1.9). Предложен [327] более чувствительный метод определения сывороточной фосфогексоизомеразы.

Определение фосфогексокиназы (фосфофруктокиназа; КФ 2.7.1.11). Об определении активности фосфогексокиназы эритроцитов у детей болезнью Дауна см. [328].

Определение фибринолитической активности крови. Предложена [329] методика определения фибринолитической активности крови (модификация).

Определение фосфофруктокиназы (КФ 2.7.1.11). Описывается [330] метод определения фосфофруктокиназной активности скелетных мышц и сердца крыс при гемической гипоксии.

Определение фруктокиназы [331] (КФ 2.7.1.4). Предложен метод определения фруктокиназы при вирусном гепатите.

Определение полинуклеотидфосфорилазы [332] (полирибонуклеотид— нуклеотидилтрансфераза; КФ 2.7.7.8). Предложен метод определения полинуклеотидфосфорилазы и ее ингибиторов.

Предложен [340] метод одновременного определения холинэстераз «истинной и псевдо» плазмы и эритроцитов в цельной крови, основанный на реакции между ацетилхолином и гидроксиламином.

Определение хитиназной активности (хитиназа; КФ 3.2.1.14) Сообщается [178], что получен «коллоидный хитин» для использования в качестве субстрата при определении хитиназной активности и описана методика получения этого субстрата.

Определение холинэстераз (КФ 3.1.1.8). Описывается [179] метод определения холинэстеразы в сыворотке крови при

помощи тест-бумажек, пропитанных раствором ацетилхолина и индикатора.

Предложен [180] микрометод определения холинэстеразы в сыворотке крови, основанный на расщеплении под влиянием холинэстеразы ацетилхолина с образованием тиохолина, дающего с 5,5--дитиобис (2-нитробензойной кислотой) желтое окрашивание.

Предложен [181, 182] манометрический способ определения холинэстеразы сыворотки и ацетилхолинэстеразы эритроцитов в аппарате Варбурга. Для определения фермента сыворотки в качестве субстрата применяют бутирилхолин, а фермента эритроцитов — ацетил-β-метилхолин. Активность фермента выражается в количестве *мл* CO_2, освободившегося во время реакции, после поправки на собственный гидролиз субстрата.

Описан [183] метод определения холинэстеразы в пробах крови, высушенных на фильтровальной бумаге, которые можно хранить в течение нескольких недель при 20 — 30° и в течение нескольких месяцев при 4°.

Был предложен [184] метод определения активности холинэстеразы в биологическом материале, основанный на реакции фермента с хлористым или бромистым ацетилхолином в присутствии веронолового буфера, и последующей реакции избытка ацетилхолина с NH_2OH по Хестрин, прибавлении $FeCl_3$ и колориметрировании образовавшегося фиолетово-красного комплекса ацетогидроксамовой кислоты с железом при 520 *ммк*.

Сообщается, что уровень холинэстеразной активности в эритроцитах определяется следующими методами: 1) непосредственным анализом красных кровяных клеток [185]; 2) определением холинэстеразной активности сыворотки или плазмы и цельной крови и гематокрита [186]; 3) анализом цельной крови в таких условиях, при которых активность плазмы можно не принимать во внимание [187].

Значительный интерес представляют исследования [188, 189], в которых автор сочетал гистохимическую методику с применением избирательных ингибиторов и реактиваторов холинэстеразы.

Некоторые авторы [190, 191] изучали распределение холинэстеразы в сыворотке или в плазме крови главным образом электрофоретическими методами с целью установить, какими белковыми фракциями крови связан этот фермент.

Предложен [192] метод определения активности холинэстеразы, в котором субстратом служит ацетилтиохолин; при инкубации его с ферментом образуется тиохолин, количество которого служит мерой активности фермента.

Известны [193, 194] методы определения холинэстеразы, в которых в качестве субстрата используются нехолиновые эфиры. Наиболее распространенным субстратом служит индофенилацетат.

Определение α-химотрипсина (химотрипсин: КФ А— 3.4.4.5; Б — 3.4.4.6). Флуорометрический метод определения α-химотрипсина см. [341].

Колориметрический метод определения химотрипсина в сыворотке крови с применением специфического субстрата гидразид-N-ацетил-L-тирозина см. [342].

Определение уреазы (КФ 3.5.1.5). Прямое потенциометрическое определение активности уреазы по количеству аммония, выделяющегося при действии фермента см. [343].

Определение урокиназы. Описано [344] спектрофотометрическое и колориметрическое определение урокиназы в крови, основанное на измерении расщепленной урокаиновой кислоты до и после инкубации.

Определение церулоплазмина. Об определении церулоплазмина см. [345 — 348].

Определение церулоплазмина. Описан хроматографический метод определения церулоплазмина в сыворотке крови человека с применением колонки с гелем сефадекса G-25 [195].

Метод определения церулоплазмина, основанный на реакции ферментативного окисления парафенилциамина, см. [196].

Определение цитохром-*c*-оксидазы. (КФ 1.9.3.1). Предложен [349] модифицированный метод определения цитохром-*c*-оксидазы в митохондриях по образованию красного пигмента из гидрохлорида диметилпарафенилдиамина в присутствии добавленного цитохрома *c*.

Определение цитохромоксидазы (КФ 1.9.3.1). Описан [350] микрометод выявления системы цитохромоксидазы на основании реакции «Нади» на фильтровальной бумаге.

Определение трипсиноподобных эстераз. Об определении трипсиноподобных эстераз см. [351].

Определение эстеразы, амидазы и аминопептидазы (эстеразы: КФ 3.1.1.1; 3.1.1.2; амидазы; КФ 3.5.1.4; аминопептидазы; КФ 3.4.1.2). Метод одновременного определения эстеразы, амидазы и аминопептидазы в гомогенатах тканей см. [352].

Определение α-, β-эстераз. Определение α-,β-эстераз сыворотки крови см. [353].

Определение холинэстеразы (КФ 3.1.1.8) и ацетилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.7). Разработан [333] быстрый полярографический метод определения активности холинэстеразы и ацетилхолинэстеразы в эритроцитах. В качестве субстрата используют ацетилхолин, а в качестве критерия активности обоих ферментов— увеличение анодной волны тиохолина.

Определение холинэстеразы [334] (КФ 3.1.1.8). Предложен спектрофотометрический метод определения атипичной сывороточной холинэстеразы с использованием *о*-нитрофенилбутирата в качестве субстрата. Колориметрические методы определения холинэстеразы при помощи агарового геля см. [335 — 338].

Определение эстеразы (арилэстераза: КФ 3.1.1.2; карбоксилэстераза: КФ 3.1.1.1; ацетилэстераза: КФ 3.1.1.6). Предложен метод определения эстеразной активности сыворотки крови [339].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Bruns F.* Bioch. Z., 1954, **325**, 156.
2. *Schapira F.* Rev. franc. études clin. biol., 1960, **5**, 500.
3. *Jasinski A., Tyburczyk W.* Acta physiol. polon., 1961, **12**, 887.
4. *Casaway W.* Amer. J. Clin. Path., 1959, **32**, 97.
5. *Scheiffarth F., Götz H.* Klin. Wschr., 1964, N 42, 130.
6. *Sax S., Trimble G.* Clin. Chem., 1963, **9**, 296.
7. *Simon K.* Med. Wschr., 1965, N 19, 377.
8. *Fingerhut B.* et al. Clin. Chem., 1965, **9**, 862.
9. *Fried R., Hoeflmayr J.* Med. Ernähr., 1965, **6**, 36.
10. *Baume P. E.* et al. Clin. chim. acta, 1966, **14**, 553.
11. *Klaus D.* et al. 1963. H. 8, 49, 15.
12. *Forsell O., Palva J.* J. Clin. Lab. Invest., 1961, **13**, 131.
13. *Reed D.* et al. Anal. Bioch., 1966, **16**, 59.
14. *Децик Ю.* Лабор. дело, 1966, № 6, 338.
15. *Eccleston J.* Bioch. Bioph. Acta, 1967, **139**, 187.
16. *Orłowski M., Shewcuk A.* Acta bioch. polon., 1961, **12**, 189.
17. *Orlowski M., Srewcuk A.* Clin. chim. acta, 1962, **7**, 755.
18. *Orlowski M., Meisber A.* Bioch. Bioph. Acta, 1963, **73**, 679.
19. *Goldbarg J.* et al. Gastroenterology, 1963, **44**, 127.
20. *Kulhanek V., Dimov D.* Clin. chim. acta, 1966, **14**, 619.
21. *Tsou K., Su H.* Anal. Bioch., 1964, **8**, 415.
22. *Постунаев В., Авдокимов В.* Лабор. дело, 1967, № 4, 224.
23. *Bonner W.*, Jr., *Cantey E.* Clin. chim. acta, 1966, **13**, 746.
24. *Guilbault G.* et al. Anal. Bioch., 1967, **18**, 241.
25. *Krisch K., Staudinger H.* Bioch. Z., 1961, **334**, 312.
26. *Kerèkyártò B.* et al. Bioch. Z., 1964, **339**, 460.
27. *Caraway W.* Clin. Chem., 1966, **12**, 184.
28. *Cordberg J.* et al. Gastroenterology, 1959, **36**, 202.
29. *Caygill J., Jevons F.* Clin. chim. acta, 1966, **13**, 61.
30. *Guntherberg H., Rost J.* Anal. Bioch., 1966, **15**, 205.
31. *Guilbault G.* Anal. Bioch., 1967, **18**, 313.
32. *Ullrich J.* Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 1959, **315**, 28.
33. *Schuech D., Kutscher H.* Z. med. Labortechn., 1962, **3**, 22.
34. *Ells H., Korkman H.* Proc. Soc. Exptl Biol. Med., 1961, **106**, 607.
35. *Hayaski T., Olmsted P.* Anal. Bioch., 1965, **10**, 354.
36. *Kovacs E., Jaki A.* J. Pathol. Microbiol., 1964, **27**, 373.
37. *Маркалов И.* Укр. биол. ж., 1966, **38**, 334.
38. *Rubin B.* et al. Endocrinology, 1961, **69**, 619.
39. *Bell J., Baron D.* Clin. chim. acta, 1960, **5**, 740.
40. *Sevela M., Tovarek J.* Casop. lekarii cesk., 1960, **99**, 1487.
41. *Grogg E.* Bull. Schweiz. Acad. med. Wiss., 1960, N 16, 305.
42. *Sevela M., Tovarek J.* Casop. lekarii cesk., 1959, **98**, 844.
43. *Dewey M., Conklin J.* Proc. Soc. Exptl Biol. Med., 1960, **105**, 492.
44. *Rosalki S.* Amer. J. Clin. Pathol., 1962, **15**, 566.
45. *Kern E., Stotz K.* Dtsch. med. Wschr., 1962, **87**, 503, 523, 524.
46. *Bumm H., Welte W.* Chirurg, 1962, **33**, 402.
47. *Swate igaku zassi.* J. Swate Med. Ass., 1961, **13**, 879.
48. *Денцнер А., Юргенсон М.* Лабор. дело, 1962, № 10, 37.
49. *Grassmann W., Nordwig A.* Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 1960, **322**, 267.
50. *Stutzenberger F.* et al. J. Bacteriol., 1966, **92**, 1005.
51. *Wakisaka V., Ishida T.* J. Vitaminol., 1958, **4**, 245.
52. *Mandracci A., Maghenzani P.* Giorn. batteriol. virol. immunol., 1960, **53**, 247.
53. *Nietson L., Ludvigsen B.* J. Lab. Clin. Med., 1963, **62**, 159.
54. *Ciampi G., Bigazzi P.* Boll. Soc. ital. biol. sperim., 1964, **40**, 284.
55. *Coutant P.* Semaine hopitaux. Pathol. biol., 1964, N 12, 1163.
56. *Laursen T.*, *Scand.* J. Clin. Lab. Invest., 1959, **11**, 134.
57. *Hicks G., Updike S.* Anal. Bioch., 1965, **10**, 290.
58. *Hadjiioannou T., Santos P.* Anal. chim. acta, 1964, **31**, 386.

59. *Capps K.* et al. Clin. Chem., 1966, **12**, 406.
60. *Hardy S.* Nature, 1965, **206**, 933.
61. *Hölzer K.*, *Binrus G.* Klin. Wschr., 1966, N 22, 1301.
62. *Briere R.* et al. Amer. J. Clin. Pathol., 1960, N 5, 544.
63. *Strandjord P.*, *Clayson K.* J. Lab. Clin. Med., 1966, **67**, 131.
64. *Knedel M.* et al. Glas-Instrum. Techn., 1966, N 7, 631.
65. *Lieve L.*, *Vogel W.* J. Lab. Clin. Med., 1961, **57**, 586.
66. *Roe J.* et al. Enzymol. biol. clin., 1966, 7, 73.
67. *Tietz N.*, *Fiereck E.* Clin. Chem. acta, 1966, 13, 352.
68. *Mody E.* Rev. med., 1966, N 4, 361.
69. *Weber H.* Dtsch. med. Wschr., 1965, **90**, 1170.
70. *Roe J.*, *Byler R.* Anal. Bioch., 1963, **6**, 451.
71. *Sarles H.* et al. Rev. franc. études clin. biol., 1963, N 7, 706.
72. *Fuhr J.* Med. Mschr., 1964, **11**, 521.
73. *Siegel F.*, *Ecanow B.* J. Pharmac. Sci., 1964, 7, 831
74. *Kocholaty W. Moxicon*, 1966, N 1, 1.
75. *Doiraki W.*, *Lieve L.* J. Lab. Clin. Med., 1964, **63**, 524.
76. *Sobral D.* Arguivos brasil endocrinol. metabol., 1965, **2**, 119.
77. *Nagatsu T.* et al. J. Biochem., 1966, **2**, 219.
78. *Green A.*, *Haughton* Th. Bioch. J., 1961, **78**, 172.
79. *Keston A.* Anal. Bioch., 1964, **9**, 229.
80. *Nagano V.* et al. Agric. Biol. Chem., 1966, **4**, 359.
81. *Hill V.*, *Sammons H.* Clin. chim. acta, 1966, **13**, 739.
82. *Ipata P.* Anal. Bioch., 1967, **20**, 30.
83. *Maley F.* et al. Anal. Bioch., 1967, **19**, 265.
84. *Klimek R.*, *Pietrzycka M.* Clin. chim. acta, 1961, **6**, 326.
85. *Bartik M.*, *Michnova E.* Veterin. med., 1966, N 11, 645.
86. *Bartik M.*, *Simko J.* Ceskosl. gynecol., 1967, N 1-2, 64.
87. *Wintersberger E.* et al. Clin. chim. acta, 1966, **14**, 786.
88. *Hardy S.*, *Ritchie J.* Nature, 1966, **209**, 76.
89. *Колесников П.* Биохимия, 1962, **27**, 193.
90. *Jasinski A.*, *Tyburckjn W.* Acta physiol. polon., 1961 **8**, 887.
91. *Swinnen J.* Clin. chim. acta, 1967, **17**, 255.
92. *Dimov D.*, *Kulhanek V.* Clin. chim. acta, 1967, **16**, 271.
93. *Corill C.*, *Thomas J.* Anal. Bioch., 1967, **19**, 211.
94. *Marrink J.*, *Gruber M.* Bioch. Bioph. Acta, 1966, **113**, 438.
95. *Pantel P.*, *Barthel* Ch. Brauwissenschaft, 1964, **7**, 246.
96. *Веремеенко К.* Укр. биох. ж., 1963, **35**, 294.
97. *Иванов И.* Биохимия, 1961, **26**, 575.
98. *Nelson W.* et al. Anal. Bioch., 1961, **2**, 39.
99. *Uriel J.* Nature, 1960, **188**, 853.
100. *Kolar J.* et al. Ceskosl. Gastroentorol. vyriva, 1964, N 4, 215.
101. *Kovacs P.* Chem. zvesti., 1963, N 3, 207.
102. *Hutton G.* et al. Anal. Bioch., 1966, **16**, 384.
103. *Marbach E.*, *Wail M.* Clin. Chem., 1967, **4**, 314.
104. *Pon N.*, *Bondar R.* Anal. Bioch., 1967, **19**,272.
105. *Heimann W.*, *Andler* St. Z. Lebensmittel-Untersuch.—Forsch., 1962, **3**, 203.
106. *Crooc E.* et al. Biochem. J., 1960, **74**, 234.
107. *Fiers W.* Anal. Bioch., 1961, **2**, 126.
108. *Fiers W.*, *Moller K.* C. r. Trav. Lab. Carlsberg, 1960, **32**, 507.
109. *Josefsson L.*, *Lagerstadt* St. Bioch. Bioph. Acta, 1963, **76**, 471.
110. *Shapira R.* Anal. Bioch., 1962, **3**, 308.
111. *Altescu E.* Anal. Bioch., 1964, **8**, 373.
112. *Le Talaer J.* et al. Clin. chim. acta, 1963, **8**, 925.
113. *Josefsson L.*, *Lagerstadt G.* Bioch. Bioph. Acta, 1963, **76**, 471.
114. *Zimmerman S.*, *Sandeen G.* Anal. Bioch., 1965, **10**, 444.
115. *Altescu E.* Enzymol. biol. clin., 1966, **4**, 305.
116. *Marino G.* et al. Boll. Soc. ital. biol. sperim., 1965, **24**, 1577.
117. *Ramaswamy K.*, *Radhakrishnan.* Clin. chim. acta, 1964, **10**, 271.
118. *Idu S.*, *Cociumian L.* Jenaer. Rundschau, 1962, **2**, 68—70.

119. *Бабаскин П.* Лабор. дело, 1966, № 3, 142.
120. *Gupta G.* et al. Med. exptl., 1960, 3, 199.
121. *Hansen P.* Nord. med., 1959, 21, 792.
122. *Henry Ch.* et al. Amer. J. Clin. Pathol., 1960, **37**, 381.
123. *Lieu Che-ming* et al. Шапьи скоэбао, Acad. med. Schanghai, Acta prim., secund., 1959, N 2, 125.
124. *Laursen T., Espersen G.* Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1959, N 1, 61.
125. *Morgenstern S.* et al. Clin. Chem., 1967, **13**, 270.
126. *Pitts F.* et al. J. Neurochem., 1965, **12**, 93.
127. *Nagatsu T.* et al. Anal. Bioch., 1964, **9**, 122.
128. *Villiers H., Ardaillon R.* Rev. franc. études clin. biol., 1959, **5**, 484.
129. *Hamolka J.* Casop. lekary cesk., 1966, **105**, 268.
130. *Trinder P., Kirkland J.* Clin. chim. acta, 1967, **16**, 287.
131. *Hicks G., Braedel W.* Anal. Chem., 1965, **37**, 354.
132. *Furuno T., Sheena A.* Clin. Chem., 1965, **11**, 23.
133. *Metge W.* et al. J. Lab. Clin. Med., 1964, **64**, 335.
134. *Beutler E., Baluda M.* Clin. chim. acta, 1966, **13**, 369.
135. *Ceriotti G., Gazzaniga A.* Clin. chim. acta, 1966, **14**, 57.
136. *Moore T.* Clin. chim. acta, 1967, **15**, 103.
137. *Alpers D.* et al. J. Biol. Chem., 1965, **240**, 10.
138. *Kammen H.* Anal. Bioch., 1966, **9**, 553.
139. *Буробин В.* Вопросы мед. химии, 1964, **10**, 627.
140. *Macyga M., Makaru K.* J. Sci. Labour., 1961, **37**, 96.
141. *Kamenik A.* et al. Pol. Tyg. Lek., 1958, N 13, 981.
142. *Мансурова И.* Лабор. дело, 1962, № 9, 26.
143. *Desnuelle P.* Enzymologie, Paris, Expans. scient. franc., 1964, 3.
144. *Lundegardh H.* Endeavour, 1959, **18**, 191.
145. *Weinberg D.* IRE. Intern. Convent. Rec., 1960, **8**, 88.
146. *Reber H.* Med. Hyg., 1961, **19**, 532.
147. *Fonty P.* Ann. biol. clin., 1961, **19**, 637.
148. *Campbell D., Moss D.* Clin. chim. acta, 1961, **6**, 307.
149. *Peterson C.* J. Urology, 1961, **6**, 1011.
150. *Sudhof H.* et al. Dtsch. med. Wschr., 1964, N 89, 217.
151. *Babson A., Phillips G.* Clin. chim. acta, 1966, **13**, 264.
152. *Klein B.* et al. Clin. Chem., 1966, **12**, 226.
153. *Manning J.* et al. Canad. J. Bioch., 1966, **44**, 755.
154. *Judd R.* et al. Amer. J. Med. Technol., 1964, 30.
155. *Keay H., Trew J.* Clin. Chem., 1964, **10**, 75.
156. *Sterling R.* Clin. Chem., 1964, **10**, 1112.
157. *Salomon L.* Anal. Chem., 1964, **36**, 1162.
158. *Алимова М.* Лабор. дело, 1964, № 36, 346.
159. *Мицусима А.* Med. Biol., 1963, **67**, 302.
160. *Tsou K., Su H.* Anal. Bioch., 1965, **11**, 54.
161. *Fischer F., Siebert G.* Klin. Wschr., 1961, N 39, 202.
162. *Remy D., Gadermann E.* Dtsch. med. Wschr., 1960, N 85, 1061, 1080.
163. *Nothstein D., Ellerbrook L.* Amer. J. Clin. Pathol., 1962, **37**, 104.
164. *Neumann H., Van Vreedendaal M.* Clin. chim. acta, 1967, **17**, 183.
165. *Hviid R.* Clin. Chem., 1967, **13**, 281.
166. *Klein B., Kaufman J.* Clin. Chem., 1967, **13**, 290.
167. *Pre J., Boigne J.* Semaine hopitaux pathol., biol., 1966, **14**, 386.
168. *Hausamen T.* et al. Clin. chim. acta, 1967, **15**, 241.
169. *Morgenstern S.* et al. Clin. Chem., 1965, **11**, 876.
170. *Lauber K., Richterich R.* Z. klin. Chem., 1966, N 4, 208, 211.
171. *Rainford P.* Arch. Bioch. Bioph., 1964, **104**, 111.
172. *Руказенкова Ж., Хнычев С.* Лабор. дело, 1967, № 1, 26.
173. *Nagano V.* et al. Agric. Biol. Chem., 1966, N 30, 99.
174. *Guroff G., Abramowits A.* Anal. Bioch., 1967, **11**, 548.
175. *Fuller R., Hunt J.* Anal. Bioch., 1966, **10**, 349.
176. *Bruns F., Hinsberg K.* Bioch. Z., 1954, **325**, 532.

177. *Брагинский Д.* Материалы Первого совещания по акт. вопр. клинич. биохимии. Рига, 1962, стр. 149.
178. *Hackman R., Goldberg M.* Anal. Bioch., 1964, **8**, 397.
179. *Hoppe F.* Med. Lab., 1966, **19**, 240.
180. *Garry Ph., Routh J.* Clin. Chem., 1965, **11**, 91.
181. *Augustinsson K., Heimburger G.* Acta physiol. scand., 1953, **30**, 45.
182. *Augustinsson K.* Acta chem. scand., 1959, **13**, 571.
183. *Augustinsson K., Holmstedt B.* Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1965, **6**, 573.
184. *Iuszkiewicz T.* et al. Med. weteryn, 1966, N 5, 303.
185. *Burman D.* Amer. J. Clin. Path., 1962, **37**, 134.
186. *Sawitsley A.* et al. J. Lab. Clin. Med., 1948, **33**, 203.
187. *MacDonald W.* et al. Arch. Ind. Hyg. Occup. Med., 1952., **6**, 271.
188. *Koelle W., Koelle G.* J. Pharmacol., 1959, **126**, 1.
189. *McIsaak R., Koelle G.* J. Pharmacol., 1959, **126**, 9.
190. *Bernsohn I.* et al. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1961, **108**, 71.
191. *Harris H.* et al. Nature, 1962, **196**, 1296.
192. *McOsker D., Daniel L.* Arch. Bioch. Bioph., 1959, **79**, 1.
193. *Kramer D., Gamson R.* Anal. Chem., 1958, **30**, 251.
194. *Magnus J., Thomspon R.* Brit. J. Dermat., 1954, **66**, 163.
195. *Saint-Blancard J.* et al. Ann. biol clin., 1965, **23**, 895.
196. *Ravin H. J.* Lab. Clin. Med., 1961, **58**, 16.
197. *Karker H.* Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1964, **16**, 570.
198. *Biron P.* et al. Proc. Soc. Exptl Biol. Med., 1964, **116**, 1074.
199. *Hiwada K.* et al. Clin. chim. acta, 1966, **14**, 410.
200. *Kokubu T.* et al. Clin. chim. acta, 1965, **12**, 484.
201. *Kokubu T.* et al. Clin. chim. acta, 1966, **14**, 410.
202. *Gniot J., Dzyaloszynski L.* Clin. chim. acta, 1964, 9, 334.
203. *Dzyaloszynski L.* et al. Clin. chim. acta, 1966, **14**, 450.
204. *Pelikan V.* et al. Clin. chim. acta, 1964, 9, 141.
205. *Dargel R.* Clin. Chem., 1966, **12**, 36.
206. *Pihar O.* Clin. chim. acta, 1966, **13**, 731.
207. *Woollen J., Turner P.* Clin. chim. acta, 1965, 12, 671.
208. *Woollen J., Walker P.* Clin. chim. acta, 1965, **12**, 647.
209. *Jacobasch G., Sylem-Rapport J.* Folia haematol., 1965, **83**, 340.
210. *Aapsen P., Kemp A.* Nature, 1964, **204**, 1195.
211. *Coltorti M.* et al. Clin. chim. acta, 1966, **13**, 568.
212. *Cernoch M., Malinska J.* Clin. chim. acta, 1966, **3**, 335.
213. *Ferris S.* Metabolism, 1964, **13**, 1478.
214. *Hue A., Free A.* Clin. Chem., 1965, **7**, 708.
215. *Fernander A.* et al. Clin. Chem., 1966, **4**, 187.
216. *Hue A., Free A.* Clin. Chem., 1965, **11**, 708.
217. *Raimondi A., Jacono S.* Quad. sclavo diagn. clin. lab., 1966, **4**, 468, 477.
218. *Ockerman P.* Clin. chim. acta, 1967, **16**, 201.
219. *Bartals H.* et al. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 1964, **336**, 13.
220. *Березов Т.* Вопросы мед. химии, 1966, **12**, 402.
221. *Keyser J., Stephens B.* Clin. Chem., 1964, 8, 736.
222. *Szasz G.* Orv. hetilap, 1963, **104**, 1843.
223. *Richterich R., Dauwalder H.* Z. klin. Chem., 1966, N **3**, 105.
224. *Filippa G.* Enzym. biol. clin., 1963, **2**, 97.
225. *Behrman J.* Clin. Chem., 1966, **4**, 211.
226. *Fridovich* J. Anal. Chem., 1964, **3**, 371.
227. Кондо Осаму. Okayama igakkai zasshi, 1962, N 8—9, 623.
228. *Sanwald R., Kirk J.* Nature, 1966, **209**, 912.
229. *Kirk J.* J. Gerontol., 1965, **3**, 357
230. *Asakura F.* et al. Clin. chim acta, 1965, **12**, 120.
231. *Kirk J.* Clin. Chem., 1963, **9**, 776.
232. *Nappi L.* et al. Rassegna med. sperim., 1964, **5**, 274.
233. *Otten J., Van Rymenant M.* Rev. franc. etudes clin., 1965, **10**, 969.
234. *Lebez D., Kopitar M.* Clin. chim. acta, 1967, **16**, 267.
235. *Kirk* J. Clin. Chem., 1963, **6**, 763.

236. *Hubl P., Bretschneider R.* Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 1964, **2—6**, 146
237. *Покровский А., Тутельян В.* Вопросы мед. химии, 1966, 12, 310.
238. *Erdös E.* et al. Clin. chim. acta, 1965, **1**, 39.
239. *Sherwin A.* et al. Clin. chim. acta, 1967, **15**, 245.
240. *Lenahan I., Phillips G.* Clin. Chem., 1966, **12**, 274
241. *Robinson N.* Clin. chim. acta, 1965, **11**, 293.
242. *Weinberg M., Adler D.* Clin. Chem., 1964, **10**, 749.
243. *Brooks L., Olkin H.* Clin. Chem , 1965, **11**, 748.
244. *Babson A., Phillips G.* Clin. chim. acta, 1965, **12**, 210.
245. *Capps R.* et al. Clin. Chem., 1966, **12**, 406.
246. *Маркелов И.* Лабор. дело, 1966, № 12, 707.
247. *Юрков Ю., Алатырцев В.* Вопросы мед. химии, 1966, **12**, 292.
248. *Юрков Ю., Алатырцев В.* Лабор. дело, 1966, № 12, 705.
249. *Gotts R., Skendzel L.* Chin chim. acta, 1966, **4**, 505.
250. *Fric P., Lojda Z.* Clin. chim. acta 1965, **2**, 111.
251. *Trew J., Nilson E.* Clin. chim. acta, 1965, **12**, 699.
252. *Richterich R., Rurger A.* Enzym. biol. clin., 1963, **2**, 65.
253. *Kreutzer H.* et al. Clin. chim. acta, 1965, **2**, 159.
254. *Kreutzer H., Eggels P.* Clin. chim. acta, 1965, **1**, 75.
255. *Kreutzer H., Fennis W.* Clin. chim. acta, 1964, **9**, 64.
256. *Kreutzer J., Kreutzer H.* Clin. chim. acta, 1965, **11**, 578.
257. *Kreutzer H., Jacobs Rh.* Clin. chim. acta, 1965, **2**, 184.
258. *Opher A.* et al. Clin. Chem., 1966, **5**, 308.
259. *Latner A., Turner D.* Clin. chim. acta, 1967, **16**, 97.
260. *Коровкин Б.* и др. Лабор. дело, 1966, № 12, 702.
261. *Weber H.* Clin. chim. acta, 1964, **10**, 521.
262. *Roth M.* Clin. chim. acta, 1964, **5**, 448.
263. *Nakagawaand S., Isuje H.* Clin chim. acta, 1964, **10**, 572.
264. *Martineck K.* et al. Clin. Chem., 1964, **12**, 1087.
265. *Fleisher G.* et al. Clin. chim. acta, 1964, **9**, 254.
266. *Weber H.* Clin. chim. acta, 1964, **10**, 521.
267. *Скуя Н.* и др. Лабор. дело, 1966, № 6, 332.
268 *Tietz N., Fiereck E.* Clin. chim. acta, 1966, **13**, 352.
269. *Popiela T.* et al. Clin. chim. acta, 1965, **11**, 283.
270. *Fraser G., Nicol A.* Clin. chim. acta, 1966, **13**, 552.
271. *Bruck C.* Clin. Chem., 1965, **8**, 41.
272. *Muir J.* Clin. chim. acta, 1967, **17**, 312.
273. *Nacagawa S., Tsuji H.* Clin. chim. acta, 1966, **13**, 155.
274. *Al-Khalidi U.* et al. Clin. chim. acta, 1965, **1**, 72.
275. *De Jorge F.* et al. Clin. chim. acta, 1965, **12**, 403.
276. *Grignani F.* et al. Enzym. biol. clin., 1963, **4**, 226.
277. *Unemoto Ts.* Chem. Pharmac. Bull., 1964, N 12, 65.
278. *Nurtman N., Axeltod J.* Bioch. Pharmacol., 1963, **12**, 1439.
279. *Брусова Л.* и др. Вопросы мед. химии, 1964, **10**, 83.
280. *Брусова Л.* и др. Укр. биох. ж., 1965, **37**, 463.
281. *Hosenfeld D.* Mschr. Kinderheilk., 1965, **113**, 297.
282. *Щербаков Ю., Коротько Г.* Лабор. дело, 1966, № 2, 76.
283. *Веремеенко К., Кизим А.* Лабор. дело, 1966, № 10, 612.
284. *Одуманова-Дунаева Г.* В сб.: Материалы XIV научной конференции. Ленингр. вет. ин-т, 1965. М., 1965, стр. 131.
285. *Bonso L.* Minerva pediatr., 1965, **17**, 1657.
286. *Fallenberg R.* von et al. Enzym. biol. clin., 1963, **4**, 240.
287. *Blackwood C.* et al. Amer. J. Obstetr. Gynec., 1965, **3**, 419.
288. *Reinwein D., Englhardt A.* Klin. Wschr., 1964, **42**, 736.
289. *Orfowski M.* Arch. immunol. therap. exptl., 1965, **13**, 538.
290. *Josefsson L.* Nature, 1964, **204**, 783.
291. *Fusuno M., Sheena A.* Clin. Chem., 1965, **11**, 23.
292. *Onnino I.* Clin. Chem., 1966, **12**, 217.
293. *Amador E.* et al. Clin. Chem., 1966, **12**, 475.
294. *Kaufman J., Klein B.* Clin. Chem., 1966, **12**, 95.

295. *Nakamura R.* et al. Clin. Chem., 1965, **11**, 846.
296. *Mannucci P., Dioguardi N.* Clin. chim. acta, 1966, **14**, 215.
297. *Sass M.* et al. Clin. chim. acta, 1964, **10**, 21.
298. *Van den Bossche H.* Clin. chim. acta, 1965, **5**, 601.
299. *Schaffert R.* et al. Clin. Chem., 1964, **10**, 519.
300. *Elliott W., Rosamilia H.* Clin. Chem., 1965, **11**, 29.
301. *Schmidt E., Schmidt F.* Enzym. biol. clin., 1963, **2**, 80.
302. *Kulhanek V., Vojtiskom V.* Clin. chim. acta, 1964, **10**, 95.
303. *Григоров Г., Страшилов Т.* Вътр. болести, 1965, **4**, 229.
304. *Schmidt F.* Klin. Wschr., 1964, **42**, 476.
305. *Reichard H.* J. Lab. Clin. Med., 1964, **63**, 1061.
306. *Kulhanek V., Vojtiscova V.* Clin. chim. acta, 1964, **9**, 95.
307. *Spencer-Peet J.* Clin. chim. acta, 1964, **10**, 481.
308. *Bergren W., Donnel G.* Clin. chim. acta, 1964, **10**, 337.
309. *Mellman W., Tedesco Th.* J. Lab. Clin. Med., 1965, **6**, 980.
310. *Нилова Н.* Вопр. мед. химии, 1966, **12**, 514.
311. *Cornblath M.* et al. Clin. chim. acta, 1965, **12**, 27.
312. *Bergmeyer H., Moeltering H.* Clin. chim. acta, 1966, **4**, 74.
313. *Perona G.* et al. Clin. chim. acta, 1964, **10**, 521.
314. *von Studnitz W.* Clin. chim. acta, 1965, **12**, 597.
315. *Kokot F., Kuska J.* Clin. chim. acta, 1965, **11**, 118.
316. *Ma L., Chem M.*, Clin. chim. acta, 1965, **12**, 153.
317. *Klein B.* et al. Clin. Chem., 1965, **11**, 998.
318. *Mellinger G., Doe R.* Clin. Chem., 1966, **12**, 620.
319. *Warnock M.* Clin. chim. acta, 1966, **14**, 156.
320. *Babson A.* et al. Clin. Chem., 1966, **8**, 482.
321. *Fishman W.* et al. Clin. chim. acta, 1965, **12**, 298.
322. *Fietz N., Green A.* Clin. chim. acta, 1965, **9**, 392.
323. *McCoy E.* et al. Clin. chim. acta, 1965, **12**, 453.
324. *Comfort D., Campbell D.* Clin. chim. acta, 1966, **14**, 263.
325. *Butterworth P.* et al. Clin. chim. acta, 1965, **11**, 220.
326. *Hodson A.* Clin. chim. acta, 1962, **7**, 225.
327. *Брагинский Д.* Лабор. дело, 1964, № 2, 75.
328. *Baikie A.* et al. Lancet, 1965, **7382**, 412.
329. *Шилко Н.* Лабор. дело, 1966, № 5, 266.
330. *Куликова А.* Вопросы мед. химии, 1966, **12**, **196**.
331. *Poznanska H.* Przegl epidemiol., 1964, **18**, 223.
332. *Lucas-Lenard J., Cohen S.* Bioch. Bioph. Acta, 1966, **123**, 471.
333. *Fiserova-Bergerova V.* Pracovni lekar, 1964, N 16, 8.
334. *McComb R.* et al. Clin. Chem., 1965, **11**, 645.
335. *Davidson C., Adie P.* Anal. Bioch., 1965, **12**, 70.
336. *Witter R.* et al. Clin. chim. acta, 1966, **13**, 76.
337. *Wetstone H., LaMotta R.* Clin. Chem., 1965, **11**, 653.
338. *Johnston D., Huff W.* Clin. Chem., 1965, **11**, 723.
339. *Yuce M., Stefanini M.* Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1965, **119**, 642.
340. *Vincent D., Segonzac C.* Ann. biol. clin., 1965, 3-4, 353.
341. *Bielski B., Freed S.* Anal. Bioch., 1964, **7**, 132.
342. *Kallos J. et al.* Canad. J. Bioch., 1965, **43**, 135.
343. *Katz S.* Anal. Chem., 1964, **36**, 2500.
344. *Буробин В.* Вопросы мед. химии, 1964, **10**, 627.
345. *Thomas E., Constantinescu R.* Clin. chim. acta, 1966, **13**, 708.
346. *Thomas E.* et al. Clin. chim. acta, 1966, **13**, 711.
347. *Colombo J., Richterich R.* Schweiz. med. Wschr., 1964, **94**, 715.
348. *Curtain C.* J. Chromatogr., 1964, **1**, 181.
349. *Малюк В.* Вопросы мед. химии, 1965, **11**, 88.
350. *Egler L., Toth M.* Kiserl. orvostud., 1963, **15**, 18.
351. *Rutkowski R.* Clin. Chem., 1966, **12**, 350.
352. *Price F.* Anal. Bioch., 1964, **8**, 24.
353. *Kristan M., Pihar O.* Clin. chim. acta, 1966, **13**, 405.

ТЕХНИКА ОТБОРА И ПОДГОТОВКИ ПРОБЫ ДЛЯ АНАЛИЗА

Для взятия пробы крови нельзя указывать единых правил, так как способ отбора зависит в основном от цели, стоящей перед исследователем. У человека обычно делают пункцию вены, у мелких животных — пункцию сердца. Можно также брать артериальную или капиллярную кровь.

Часто приходится работать с очень небольшими количествами крови, в связи с чем частично и вызвано развитие микрометодики. В этих случаях удобно брать кровь путем укола пальца или мочки уха [1]. В первом случае палец моют с мылом горячей водой, тщательно обсушивают, протирают кусочком ваты, смоченной спиртом, затем эфиром, после чего вытирают досуха ватой или фильтровальной бумагой. Укол делают в мякоть пальца немного ниже ногтя. При взятии крови из мочки уха ее смачивают 2—3 каплями толуола, для того чтобы вызвать гиперемию, делают укол и, взяв кровь, вытирают ранку спиртом, покрывают ее кусочком марли и зажимают деревянными щипчиками. Делать повторные уколы в мочку уха гораздо менее болезненно, чем в палец.

При взятии крови из мочки уха можно набрать до 1 *мл*, если на очищенную спиртом и вытертую досуха поверхность мочки нанести тонкий слой стерильного вазелина (этим задерживается свертывание крови).

Чтобы помешать свертыванию крови, можно также предварительно посыпать место укола мелким порошком оксалата, но обычно без этого можно обойтись.

Первую выступившую каплю крови всегда удаляют вытиранием. После каждого взятия крови остатки ее стирают, а если кровь нужна еще, ее берут из новой выступившей капли.

Для взятия крови из укола пользуются абсолютно чистыми микропипетками, промытыми сначала хромовой смесью, затем дистиллированной водой, спиртом, эфиром и высушенными током воздуха. Кончик пипетки приводят сбоку в соприкосновение с каплей крови, причем пипетку держат горизонтально, чтобы кровь легко входила в нее. Лучше всего воздержаться от насасывания крови в пипетку, так как при этом часто попадают пузырьки воздуха, и приготовить пипетки такого диаметра (1—1,7 *мм*), чтобы кровь сама поднималась в них в силу капиллярности. Пипетки должны быть предварительно тщательно проградуированы.

Набрав кровь до метки, кончик пипетки обтирают кусочком фильтровальной бумаги или чистой льняной тряпочкой, после чего взятую кровь вводят в соответствующий сосуд. Пипетку несколько раз ополаскивают дистиллированной водой или другой подходящей жидкостью и промывную жидкость также вливают в сосуд.

Необходимо помнить, что по своему составу капиллярная кровь ближе к артериальной, нежели к венозной крови [2].

---

[1] У маленьких детей кровь можно брать из большого пальца ноги или пятки.

[2] Чтобы еще больше приблизить состав капиллярной крови к артериальной, кисть руки предварительно нагревают погружением на 15 мин. в горячую воду (45°), после чего вытирают насухо и, сделав глубокий укол в мякоть, собирают капли крови под слой вазелинового масла в стеклянный сосуд, стенки которого покрыты слоем щавелевокислого натрия или калия.

При всех достоинствах метода взятия крови из пальца этот способ имеет свои недостатки. Прежде всего, несмотря на все предосторожности при взятии капиллярной крови, к ней все же примешивается некоторое количество лимфы, что меняет состав исследуемой крови.

Чтобы избежать надавливания и вместе с тем получить большое количество крови, приходится делать более глубокий укол, который значительно болезненнее пункции вены. С этим особенно приходится считаться в тех случаях, когда исследуют плазму крови обычными микрометодами и, следовательно, нужно взять не менее 0,5 *мл* крови.

При взятии крови из вены (или артерии) этих препятствий не встречается. Единственным затруднением является «найти вену» у тучных субъектов, женщин и детей.

Артериальную кровь у человека берут путем пункции лучевой или бедренной артерии.

При взятии крови из лучевой артерии направление последней определяют ощупыванием руки пациента, положенной на стол, и отмечают положение артерии легкими чернильными штрихами. Затем слегка смазывают кожу йодом и приступают к пункции. Место пункции обычно лежит на 2 поперечных пальца выше головки лучевой кости. Руку пациента слегка сгибают в дорсальном направлении, для того чтобы артерия напрягалась и не так легко ускользала от укола. Сгибание не должно быть чрезмерным, и пульсация артерии при этом должна хорошо чувствоваться. Иглу шприца отверстием кверху втыкают коротким толчком в место пункции почти параллельно коже и в направлении хода артерии. Затем начинают постепенно всасывать кровь, которая, поступая в шприц, передвигает поршень пульсирующими толчками (доказательство попадания в артерию). Набрав нужное количество крови, иглу быстро выдергивают и место укола тотчас прижимают стерильной марлей. Ранку затем закрывают кусочком марли и пластырем.

У человека кровь из вены (обычно из локтевой) берут, предварительно протерев спиртом кожу над веной, после чего иглу шприца (отверстием кверху) втыкают в вену под углом около 50° к поверхности руки, придерживая вену большим и указательным пальцами. Отпустив жгут (эластический плоский поясок или каучуковую трубку), которым предварительно туго обхватывают руку пациента несколько выше локтя, собирают кровь в шприц или же (воткнув иглу без шприца) в пробирку (в последнем случае просвет иглы должен быть более широким; вообще же рекомендуется пользоваться короткими и острыми иглами)[1]. Удобнее всего брать кровь из ясно выступающей вены, которая имеет настолько хорошую опору из подкожных тканей, что не ускользает от иглы. Кровь обычно берут из лучевой или срединной наружной подкожной, или внутренней подкожной вены руки. Последняя удобна для взятия крови, но требуется особый навык, чтобы не попасть в расположенный поблизости нерв и в плечевую артерию, которую отделяет от указанной вены только связка двуглавой мышцы. Если возможно, жгутом не пользуются, взамен чего слегка прижимают вену в момент вкалывания иглы и быстро отпускают, как только кровь начнет вытекать.

У маленьких детей и младенцев кровь можно брать из наружной яремной или височной вены.

У крупных животных (лошадь, корова) кровь берут из ушной или яремной вены и сонной артерии; у собак — из подкожной вены нижней конечности, ушной или яремной вены, лучевой вены передней ноги и бедренной артерии.

У кролика кровь обычно берут из ушной вены при помощи иглы или надреза вены ланцетом. Место надреза освобождают от волос, протирают спиртом и эфиром. Можно брать кровь также из надчревной или сонной артерии. Большое ко-

---

[1] Как правило, желательно избегать наложения жгута, если же это невозможно, то следует отбросить первые 2—3 капли крови, чтобы несколько уменьшить влияние застоя, вызванного наложением жгута, на состав анализируемой крови.

личество крови (15—20 *мл* у крупных кроликов) можно брать путем пункции сердца (но не чаще 2 раз в месяц).

Для взятия крови употребляют только стерильные и сухие инструменты; кровь собирают в сухой сосуд, обычно стерильный, который тотчас закрывают ватой, чтобы избежать испарения; нужно стараться выбирать сосуд такого размера, чтобы взятое количество крови почти полностью заполнило его. Анализ крови производят по возможности тотчас после взятия. Если для исследования нужна сыворотка, то кровь собирают в стерильную пробирку, закрывают ватой и, наклонив пробирку, окружают ее ватой и оставляют так, чтобы она по возможности сохраняла свою температуру во время свертывания. Если кровь поместить тотчас после взятия в ледник, то при свертывании она может настолько крепко пристать к стенкам пробирки, что сыворотку трудно отделить так, чтобы не увлечь с ней и кровяных шариков.

Для облегчения отделения сыворотки пробирку слегка встряхивают или постукивают по ней пальцем. Можно также обвести внутренние стенки пробирки платиновой проволокой или тонкой стеклянной палочкой.

Часа через 3 сыворотка обычно отделяется полностью. Ее осторожно сливают, так чтобы при этом не захватить и красных кровяных шариков. От последних в случае надобности сыворотку освобождают центрифугированием.

Если исследованию подлежат плазма или эритроциты (или цельная кровь, которую анализируют не сразу после взятия), то кровь собирают в сосуд, содержащий небольшое количество вещества, предупреждающего свертывание и гемолиз; для этой цели обычно берут щавелевокислые или лимоннокислые соли, фтористый натрий, гирудин, гепарин и другие соединения, в зависимости от характера последующего определения. Нужно всегда обращать внимание на то, чтобы концентрация этих веществ не была слишком высокой, так как это может отразиться на последующем определении. Обычно на 10 *мл* крови берут 0,01—0,02 *г* оксалата, 0,01—0,02 *г* фтористого натрия или 3—4 капли раствора гирудина [1].

Если исследованию подлежит плазма и в качестве средства, предупреждающего свертывание крови, пользуются щавелевокислым калием или натрием [2], то лучше всего собирать кровь в подготовленную следующим образом пробирку. в нее отмеряют 0,5 *мл* раствора оксалата такой концентрации (например, 1,3%-ный раствор оксалата натрия), чтобы на 10 *мл* взятой крови пришлось 0,02 *г* оксалата, и выпаривают досуха почти в горизонтальном положении на электрической плитке. Испаряющийся раствор разбрызгивается, образуя пленку высохшего оксалата на стенках пробирки. Можно также выпаривать досуха на небольшом огне, постоянно вращая пробирку, а по охлаждении закрывая пробкой.

Гепарин необходимо тщательно смешивать с кровью во избежание образования мелких сгустков. Лучше всего приготовить водный раствор гепарина, отмерить в сосуд для взятия крови потребное количество этого раствора и высушить при температуре не выше 30°, так чтобы на стенках сосуда остался тонкий налет гепарина.

Дефибрированную кровь готовят, собирая ее в стаканчик, где кровь осторожно взбалтывают стеклянной палочкой, не касаясь стенок стаканчика.

---

[1] Если нет готовых препаратов гирудина, то его раствор готовят, помещая несколько головок пиявок в спирт, затем высушивая их и растирая в порошок. Одну часть порошка кипятят со 100 частями 1%-ного раствора хлористого натрия и фильтруют.

[2] Щавелевокислый натрий менее растворим, чем соль калия, и это является преимуществом, так как избыток растворенного в крови оксалата может влиять на процесс приготовления безбелкового фильтрата крови. Кроме того, присутствие оксалата калия может способствовать образованию мочевой кислоты. Щавелевокислый натрий вызывает некоторое уменьшение объема эритроцитов и изменение распределения аминоазота в крови, но в меньшей степени, чем щавелевокислый калий или лимоннокислый натрий.

Для исследования эритроцитов дефибрированную кровь центрифугируют и осадок эритроцитов отмывают физиологическим раствором. Следует, однако, помнить, что не только промывание, но и само изолирование может значительно изменить химический состав эритроцитов.

Поэтому определение концентрации того или иного вещества в эритроцитах чаще ведут косвенно на основании анализа цельной крови и плазмы и соответствующего вычисления после установления количественного соотношения между форменными элементами и плазмой.

Для определения pH кровь собирают (избегая венозного застоя) под парафиновое масло при помощи специального приспособления. Такое взятие крови без доступа воздуха практикуют и для некоторых других анализов.

Лучше всего исследовать кровь сразу после ее взятия; очень удобно иметь шприц, которым можно было бы не только брать, но и отмеривать кровь. Для точного отмеривания минимальных количеств крови желательно пользоваться шприцем-микропипеткой.

Количество взятой крови, конечно, зависит от характера исследования, но во всяком случае крови должно быть достаточно для выполнения двух параллельных определений. При этом нужно помнить, что объем получающейся сыворотки обычно несколько меньше половины объема взятой крови.

Ниже приводим описание способа взятия проб крови, сыворотки, плазмы и форменных элементов в тех случаях, когда анализ ведут, применяя специальные ультрамикрометоды, для которых достаточно всего 0,03—0,05 *мл* пробы.

Если сыворотка нужна в количестве 25 *мкл*, кровь берут из мякоти пальца или мочки уха в капиллярную трубку диаметром 1,5—2 *мм*, длиной 10 *см*, которая на $^3/_4$ наполняется за счет капиллярности. Трубку наклоняют так, чтобы кровь дошла до середины, причем надо следить, чтобы один конец трубки оставался сухим. Концы трубки запечатывают следующим образом: кусочек замазки расплавляют на огне и прикладывают к сухому концу капилляра, кончик которого тоже согревают в боковом участке пламени. Для запечатывания этого конца нужна твердая замазка, и стекло трубки должно быть достаточно теплым, чтобы ее растопить. Но кровь не должна нагреваться, в противном случае наступает гемолиз. Другой конец капилляра закупоривают небольшим кусочком мягкой замазки, не нагревая трубку. Капилляры центрифугируют 5—10 мин. при 3000 *об/мин*, причем их помещают плотно закупоренным концом вниз. За один прием можно отцентрифугировать большое количество проб, завернув каждый капилляр в отдельный кусочек бумаги с соответствующей надписью. Следует избегать нагревания проб при центрифугировании: это может вызвать потерю таких веществ, как аскорбиновая кислота.

Используя описанным выше способом два капилляра, можно собрать до 50 *мкл*. Кровь в объеме 150—300 *мкл* удобнее собирать трубками диаметром 4 *мм* и длиной 10 *см*. Сдавливая, а если нужно и нагревая руку, можно легко и быстро получить нужное количество крови. Несколько миллиметров наружной поверхности трубки, считая от сухого конца, покрывают вакуумной смазкой или вазелином; после наполнения трубку плотно закрывают вакцинным колпачком. Перед центрифугированием колпачки на смазанных концах трубок заклеивают полосками липкого пластыря.

Если от момента взятия крови и до анализа проходит несколько часов, то рекомендуется хранить пробы крови при температуре, близкой к нулю. При таких условиях на протяжении 24—28 час. не происходит заметной потери аскорбиновой кислоты. В полевых условиях или при перевозках полезно пользоваться термосами емкостью около 4 *л*, снабженными стеллажами из толстой проволоки, под которые закладывают лед.

После центрифугирования трубки вскрывают по царапине, нанесенной алмазом над уровнем сыворотки. Сыворотку в таком виде можно брать специальной пипеткой с оттянутым узким кончиком. Сыворотку, которую предполагают сохранять в замороженном виде, переносят в пробирки размером 6 × 50 *мм*, которые плотно закупоривают вакцинными колпачками.

Для взятия эритроцитов или плазмы в капиллярные трубки малого объема наливают предварительно 1 *мкл* раствора гепарина или другого стабилизатора, а в трубки большого объема — 6 *мкл*. Трубки наклоняют для того, чтобы раствор гепарина смочил стенки, и затем высушивают их на воздухе.

После взятия обычным способом проб к сухому концу трубки немедленно присоединяют резиновую грушу и содержимое для лучшего перемешивания несколько раз выдувают на стеклянную пластинку и насасывают обратно в трубку. После этого трубку запечатывают, снабжают этикеткой, центрифугируют и затем открывают; пробы клеток и плазмы отбирают так же, как и сыворотку.

Для взятия пробы лейкоцитов нужны:

1. Пипетки для отмеривания крови диаметром 5—6 *мм* с коротким концом, суженным до 1 *мм* (внешний диаметр) и с отверстием не менее 0,5 *мм* в диаметре. Резкое сужение на уровне объема в 0,1—0,12 *мл* предупреждает случайное засасывание крови слишком далеко в пипетку. Эта некалиброванная пипетка вследствие сужения напоминает пипетки с сужениями для количественного отмера. Внутреннюю часть пипетки парафинируют, причем пипетку сначала нагревают, затем в нее насасывают и выдувают расплавленный парафин, после чего охлаждают ее водой. Таким путем образуется тонкая равномерная пленка парафина, предупреждающая свертывание крови.

2. Мешалка из стекла или из нержавеющей стали, представляющая собой стержень диаметром 1—1,5 *мм* и длиной 75 *мм*; основание в виде ровной площадки диаметром 2,5—3 *мм*.

3. Пастеровская пипетка емкостью 1—1,5 *мл* с согнутым кончиком для перенесения суспензии белых кровяных телец.

4. Приспособление для отделения верхней части жидкости от белых кровяных телец: маленькая стеклянная трубочка с согнутым узким концом с внешним диаметром не более 0,5 *мм*, соединенная резиновой трубкой через склянку, емкостью в 20—50 *мл* с трубкой для отсасывания ртом.

5. 1,6%-ный раствор оксалата калия, который должен сохраняться при 4°. Перед употреблением его следует отцентрифуговать для удаления возможных следов взвешенных частиц.

В пробирку 6 × 50 *мм* наливают 0,5 *мл* 1,6%-ного раствора оксалата калия и опускают палочку для перемешивания. Палец, протертый спиртом, прокалывают и после удаления остатков спирта поверхность его слегка смазывают вазелином; первую каплю крови стирают. Как можно быстрее наполняют кровью парафинированную пипетку и кровь переносят в пробирку, содержимое которой сразу же осторожно, но тщательно перемешивают палочкой. Пипетку ополаскивают свежим раствором оксалата. Пробирку центрифугируют в течение часа с малой скоростью, подобранной так, чтобы на дно оседали главным образом красные кровяные тельца, а лейкоциты оставались в надосадочной жидкости. Оптимальное время центрифугирования равно удвоенному интервалу, который требуется для осаждения на дно основной массы красных кровяных телец. Чтобы не было взмучивания пробы, центрифуга должна останавливаться плавно.

Мутный верхний слой, содержащий белые кровяные тельца, переносят пастеровской пипеткой в другую пробирку такого же размера. Суспензию, находящуюся в непосредственной близости от слоя красных кровяных телец, брать не следует, так как она обычно содержит некоторое количество эритроцитов. Вторую пробирку центрифугируют не позже чем через 2 часа при 3000 *об/мин* в течение 15 мин. Прозрачную надосадочную жидкость отсасывают специальным приспособлением [1] и отбрасывают. Нужно постараться удалить как можно больше жидкости,

[1] Приспособление состоит из стеклянной трубочки (внешний диаметр не более 0,5 *мм*) с согнутым узким концом, которая соединена через склянку емкостью 20—55 *мл* с трубкой для отсасывания ртом.

не потеряв при этом осадка. Если удалить 90% жидкости и дать жидкости в пробирку стекать 5—10 мин., то последние 10% удается удалить более полно. После этого белые кровяные тельца готовы для исследования.

При изучении химизма тканей и органов исследователь должен воспроизвести по возможности ту картину, которая имела место во время нахождения тканей in vivo в составе живого организма как целого. Даже при современном уровне техники биохимических исследований решение этой задачи представляется далеко не легким.

Удаление ткани из организма, нарушение ее связи с центральной нервной системой, нарушение кровообращения и т.д. не могут не оказывать значительного влияния на течение биохимических процессов и в ряде случаев приводят к полному искажению прижизненной картины. Самый процесс взятия кусочка ткани для анализа у ненаркотизированного животного является травмой, т. е. весьма сильным раздражителем центральной нервной системы.

Предварительный убой животного (путем обезглавливания, воздушной эмболии, впрыскивания хлороформа в сердце, обескровливания, воздействия электрическим током и т.п.). вызывает такие глубокие изменения в организме, которые при исследовании лабильных биохимических субстратов могут совершенно исказить результаты. Применение тех или иных видов наркоза также не безразлично, так как при наркозе нарушается нормальная нервная регуляция функций. Со всеми этими обстоятельствами экспериментатор не может не считаться.

Наконец, далеко не безразлично, что предполагается исследовать: содержание тех или иных субстратов или ферментативную активность. В первом случае необходимо быстро затормозить деятельность ферментов и получить своего рода «моментальную фотографию» химического статуса ткани. Во втором случае надо ткань получить в таком состоянии, чтобы ферментные системы сохранились по возможности неприкосновенными. Первая задача решается легче, чем вторая.

Хорошим методом фиксации тканей является моментальное их замораживание в жидком воздухе или кислороде; при отсутствии их можно пользоваться охладительными смесями из эфира или ацетона с сухим льдом (твердая угольная кислота). Смеси эти готовят следующим образом: берут два фарфоровых стакана, причем один вставляют внутрь другого; между наружной стенкой меньшего и внутренней поверхностью большего образуется воздушная прослойка. Внутренний стакан до половины заполняют ацетоном или эфиром, после чего в него осторожно опускают кусочки сухого льда. При растворении льда жидкость бурно вскипает и температура ее понижается. Продолжая опускать лед под контролем термометра для низких температур, можно достигнуть понижения температуры до 77—80°. Раствор при этом остается жидким и его можно использовать для замораживания тканей. Однако скорость промерзания, особенно при замораживании значительных по величине объектов, здесь меньшая, чем в случае применения, например, жидкого кислорода, имеющего температуру — 183°.

Наиболее надежным способом является быстрое погружение целого животного в сосуд с жидким кислородом. Этот способ очень хорош при работе с мелкими животными (беспозвоночные, лягушки, ящерицы, мыши, крысы). Можно применять специальную клетку, из которой животное в нужный момент само выпрыгивает в сосуд с жидким кислородом.

Однако погружать животное в жидкий кислород можно и иными способами. Промерзание тушки происходит очень быстро (2—3 сек.). Перенеся тушку в стальную ступку и раскалывая ее молотком или пестиком, предварительно прикрыв чистой полотняной тканью во избежание разлетания обломков, можно легко выделить и извлечь любую ткань или орган, которые затем растирают в порошок при непрерывном подливании новых порций жидкого кислорода для предохранения от оттаивания.

Измельчение в порошок обязательно в тех случаях, когда орган исследуется не целиком, так как только при тщательном измельчении можно взять навески, являющиеся действительно средней пробой органа. Последнее необходимо, так как количество исследуемых веществ в разных частях органа часто бывает неодинаковым (например, содержание гликогена в разных долях печени, фосфокреа-

тина в участках мышцы, богатых нервными окончаниями и бедных ими, и т.д.).

При работе с более крупными животными замораживание целого животного трудно выполнимо. В этом случае можно применять замораживание отдельных частей тела. Так, например, некоторые авторы замораживают головной мозг «на месте», погружая в чашку с жидким кислородом затылочную область животного, в результате чего наступает промерзание мозга и прекращение рефлекторной деятельности. Этот прием используется в ряде биохимических лабораторий, но уступает замораживанию целого животного, так как промерзание головного мозга происходит медленнее.

Третий способ — это быстрая фиксация в жидком воздухе или кислороде кусочка ткани, вырезанной у наркотизированного или предварительного забитого животного.

При изучении процессов обмена веществ применение наркотиков жирного ряда (хлороформ, эфир) нежелательно, так как сопровождается значительным возбуждением животного в момент наркотизирования, а кроме того, приводит к изменениям углеводного обмена (усиление гликогенолиза, «наркозная гипергликемия» и пр.).

Наиболее подходящими наркотиками являются производные барбитуровой кислоты (амитал, пентотал, гексенал), дающие глубокий равномерный сон и не вызывающие резких изменений обмена веществ. При исследовании химизма центральной нервной системы применение наркоза без специальной к тому надобности нежелательно.

Дозировка барбитуратов, дающая глубокий равномерный сон у животных, составляет 50—100 *мг* на 1 *кг* веса (в 1—5%-ном растворе). Амитал вводят подкожно или внутрибрюшинно, а пентотал и гексенал — внутривенно [1].

Техника взятия органов у наркотизированных животных следующая: у спящего животного (отсутствие заметной реакции на болевой раздражитель определяется придавливанием кончика хвоста или конечности) разрезают кожу и открывают свободный доступ к нужному органу. Кусочек органа быстро вырезают острой бритвой и бросают в сосуд с жидким кислородом. Если органом, подлежащим исследованию, является сердце, то перед вскрытием грудной клетки (пневмоторакс!) производят трахеометрию и в трахею вводят канюлю, через которую осуществляется искусственное дыхание.

При взятии для исследования мышц следует предварительно, не нарушая кровообращения и не травмируя мышцу, осторожно отпрепаровать ее от окружающей жировой и соединительной ткани и, вырезая мышцу, стараться не захватить вместе с ней сухожилие [2].

По измельчении замороженной мышцы следует выбрать и удалить из полученного порошка остатки сухожилий, которые хорошо заметны на глаз и похожи на короткие иголочки сероватого цвета, тогда как собственно мышечная ткань имеет вид бледно-розового порошка.

В ряде случаев обстановка эксперимента не позволяет применять наркоз (например, при исследовании мышц сразу после работы, когда наркотизирование, даже быстрое, является «отдыхом»). В этим случаях, если нет возможности зафик-

---

[1] Следует, однако, иметь в виду, что барбитураты тоже не вполне индифферентны для обмена веществ, так как они, как всякий наркотик, выключают нормальную нервную регуляцию функции. Так, например, исследование химизма покоящихся мышц в условиях применения амитала и без него дает одинаковую картину, а работа мышц в обычных условиях и в наркозе сопровождается совершенно различными изменениями химизма мышц. Таким образом, даже барбитураты следует применять весьма осмотрительно и лишь в тех случаях, когда у экспериментатора нет другого выхода.

[2] При исследовании мышц следует брать строго всегда одну и ту же мышцу, а не конгломерат из различных мышц. Мышцы, выполняющие различные функции (более статическую или более динамическую), существенно отличаются своим химизмом.

сировать животное целиком, приходится прибегать к тому или иному способу забивания.

При исследовании головного мозга можно произвести быструю декапитацию с немедленным погружением отделенной головы в жидкий кислород. Точно так же можно помещать в жидкий кислород быстро отделенную конечность.

Применение фиксации быстрым замораживанием обязательно при исследовании лабильных фосфорных соединений (аденозинтрифосфата, фосфокреатина, гексозофосфорных эфиров) и молочной кислоты в головном мозге, а также аденозинтрифосфата и молочной кислоты в мышцах. Она весьма желательна и при исследовании фосфокреатина, гексозофосфатов и азотистых фракций в мышцах и сердце. Однако некоторые исследователи для этой цели успешно применяют фиксацию в хорошо охлажденной на льду трихлоруксусной кислоте. Для этого за 1—2 часа до опыта ступку или фарфоровую чашку с необходимым количеством трихлоруксусной кислоты точно взвешивают и помещают в рефрижератор или на лед. Наиболее удобно пользоваться сухим льдом, так как при этом не смачивается наружная поверхность чашки, что может сказаться на результатах взвешивания. Если пользуются обычным льдом, то чашку следует отделить от него целлофаном или кленкой. Вместо льда можно употреблять охладительные смеси, дающие значительное понижение температуры. Так, смесь трех частей снега с одной частью NaCl дает температуру до — 31°; 10 частей $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ с 7 частями снега до — 55°; растворение NH_4NO_3 в равном по весу количестве воды дает понижение температуры до — 15°. Быстро вырезанную мышцу или сердце помещают в охлажденную трихлоруксусную кислоту и быстрым, энергичным движением пестика раздавливают, а затем измельчают. При хорошем навыке фиксация происходит быстро и дает результаты, не уступающие полученным при применении жидкого воздуха или кислорода. Величина взятой навески определяется вторичным взвешиванием чашки.

Исследование более устойчивых биохимических субстратов не требует обязательного применения жидкого кислорода. Так, при определении гликогена быстрое помещение кусочка мышцы или печени в нагретый на кипящей водяной бане 40%-ный раствор KOH дает результаты, почти не отличающиеся от тех, которые получаются при предварительном замораживании ткани. Разница в содержании гликогена в мышцах и печени при этих двух методах обработки ткани составляет 20—40%, а в мышце сердца и головном мозге 5—10 *мг* %, т.е. лежит в пределах ошибки метода.

Быструю фиксацию ткани необходимо применять при определении молочной кислоты. Действительно, потеря 20—30 *мг* % гликогена при содержании его в мышцах в количестве 500—800 *мг* % несущественна, а прирост молочной кислоты, образовавшейся из этого гликогена и составляющей 40—60 *мг* %, при исходном содержании ее 18—25 *мг* % совершенно искажает результаты.

При определении фракций гликогена («свободной» и «связанной») можно пользоваться фиксацией ткани в небольшом объеме кипящей воды. Это воздействие моментально прекращает деятельность гликогенолитической ферментной системы и приводит к извлечению в раствор «свободной» фракции гликогена.

Определение еще менее лабильных субстратов совершенно не требует быстрой фиксации.

При определении жира, фосфолипидов, холестерина, миоглобина и т.п. взятую ткань подвергают обычному измельчению и затем экстрагируют соответствующим растворителем.

Помимо описанных выше методов, ткань органов для исследования можно брать у животных и прижизненно, используя предложенную в 1935 г. Е. С. Лондоном органостомию[1].

Пробы тканей, легко доступных для исследования (например, кожа), могут быть взяты путем биопсии.

Для взятия пробы кожи шерсть у животного на предполагаемом месте взятия выбривают, затем специальным трепаном сверлящим движением вырезают кружок

---

[1] В. С. Асатиани. Биохимический анализ. Заключительная часть. Тбилиси, изд. «Цодна», 1960, стр. 402.

кожи диаметром около 1 *см*. От нижележащих тканей кожу быстро отделяют ножницами. Остатки жировой клетчатки тщательно удаляют, и взятую пробу подвергают анализу.

При исследовании костной ткани кости тщательно очищают от мышц, жира и надкостницы, для чего их скоблят ножом до получения однородной гладкой поверхности, после чего хирургической пилой выпиливают необходимые кусочки кости, подвергая их затем высушиванию до постоянного веса при температуре 105°. При заборе проб костной ткани следует помнить, что содержание химических ингредиентов (азот, минеральные соли) в различных участках кости неодинаково.

При изучении активности ферментов сохранить картину, которая имела место при нахождении исследуемой ткани in situ, не представляется возможным. Всякие методы фиксации тканей здесь неприемлемы, так как они приводят к нарушению ферментных систем. Определяя активность фермента in vitro, мы, по сути дела, изучаем потенциальные возможности ферментной системы в зависимости от следов того или иного экспериментального воздействия на организм, а не фактическую активность его в момент взятия ткани.

Таким образом, самый принцип исследования имеет существенные недостатки. Однако лучших методов мы не знаем, если не считать косвенного определения активности ферментов по степени обновления тех или иных субстратов в целостном организме методом меченых атомов.

Для определения активности ферментов можно пользоваться срезами тканей, тканевой кашицей, гомогенатом или экстрактом.

Подлежащие исследованию органы возможно более быстро берут у предварительно забитого или наркотизированного животного (в зависимости от условий опыта), отделяют от посторонних тканей, ополаскивают водой или физиологическим раствором и сушат плотной фильтровальной бумагой. Рыхлые сорта бумаги не годятся, так как они могут оставлять на исследуемой ткани ворсинки.

При выборе способа измельчения следует помнить, что в срезах клетки органа наименее травмируются; в кашицах травмирование клеток тем больше, чем выше степень измельчения; в гомогенатах почти полностью разрушены форменные элементы органа, а в экстрактах налицо уже бесклеточная среда. Вместе с тем диффузия метаболитов, а также проникновение в ткань кислорода или тех или иных вводимых в систему веществ происходит тем полнее, чем меньше величина частиц ткани в кашице.

Срезы делают обычной бритвой или лезвием безопасной бритвы, но при этом требуется некоторый навык, так как толщина срезов при параллельных анализах должна быть одинаковой и не превышать 0,2 мм. При разной толщине срезов диффузия метаболитов и проникновение кислорода неодинаково, что существенно искажает результаты анализа. Техника приготовления срезов подробно описана В. В. Умбрейтом, Р. Х. Буррисом и Дж. Ф. Штауффером (Москва, 1951) в книге «Манометрические методы изучения тканевого обмена».

Для получения тканевой кашицы кусочек ткани или органа, высушенный от крови фильтровальной бумагой, помещают на охлажденную стеклянную пластинку и быстро, но тщательно измельчают острыми ножницами до получения кашицеобразной, гомогенной консистенции. Можно применять также растирание ткани в охлажденной фарфоровой ступке с небольшим количеством тщательно промытого сухого кварцевого песка [1]. При небольших количествах ткани можно пользоваться мясорубкой Латапи. Наибольшая степень измельчения достигается при помощи различных гомогенизаторов.

Весьма удобен гомогенизатор типа Уоринга, снабженный набором стаканов различной емкости и из различного материала (стекло, алюминий, нержавеющая сталь).

Этот прибор удобен тем, что позволяет при необходимости вести работу в асептических условиях.

---

[1] Применение кварцевого песка недопустимо в тех случаях, когда одновременно предполагается и определение сухого веса.

Более простой тип гомогенизатора для измельчения небольших количеств ткани представляет собой пробирку из стекла «пирекс» с пришлифованным стеклянным или стальным пестиком, имеющим 6 или 7 режущих зубчиков высотой не более 1 *мм*. Вращение пестика осуществляется мотором с конической передачей, дающим 1000 оборотов в минуту.

Тканевые экстракты готовят путем извлечения фермента из тканевой кашицы или гомогената соответствующим растворителем с последующим центрифугированием.

Для определения ряда внутриклеточных ферментов подготовка тканей отличается некоторыми особенностями. В качестве примера приводится описание такой подготовки для анализа печеночной ткани человека.

Пунктат печени человека в виде цилиндриков, полученных при помощи специальной иглы, весом от 10 до 50 *мг* (свежая ткань) высушивают на фильтровальной бумаге, удаляя остатки крови, и взвешивают на торзионных весах. После этого навеску быстро помещают в стеклянный гомогенизатор, куда добавляют по 0,04 *мл* 0,9%-ного раствора хлористого натрия ($6,6 \cdot 10^{-4}$ *М* по ЭДТА) на каждый миллиграмм сырого веса печени, вслед за чем гомогенизируют в ледяной бане в течение 2 мин. (контроль по секундомеру). Для определения ферментов берут обычно по 0,5 *мл* гомогената (в частности, для определения трансаминаз и дегидрогеназы глутаминовой кислоты); оставшийся гомогенат подвергают центрифугированию при $0 \pm 1,5°$ и 15 000 *об/мин* в течение 20 мин. С момента взятия пунктата печени до начала центрифугирования должно пройти не более 5 мин. Чистую надосадочную жидкость сливают в охлажденный сосуд, гомогенат и надосадочную жидкость (как субстраты и вспомогательные ферменты для анализа) держат на протяжении всего анализа в ледяной бане.

Для определения растворимого белка (биуретовым методом или по Лоури) берут 0,05 *мл* надосадочной жидкости.

Приготовление безбелкового фильтрата крови

Осаждение белков крови вольфрамовокислым натрием ($Na_2WoO_4 \cdot 2H_2O$). В эрленмейровскую колбочку отмеряют 7 объемов воды[1] и на дно медленно приливают из пипетки один объем стабилизированной крови. Пипетку ополаскивают водой из верхнего слоя жидкости в колбочке, смесь разбалтывают для получения лакированной крови, прибавляют один объем 10%-ного раствора вольфрамовокислого натрия и размешивают.

Затем к жидкости в колбочке приливают из бюретки по каплям при постоянном размешивании один объем 2/3 н. раствора серной кислоты, закрывают колбочку каучуковой пробкой и взбалтывают. Если осаждение произведено правильно, могут образоваться единичные пузырьки воздуха (но не пена), и жидкость окрашивается в красновато-бурый и под конец в темно-бурый цвет.

Жидкость оставляют стоять на 5—10 мин. и затем фильтруют через двойной складчатый фильтр (можно заменить фильтрование центрифугированием). Фильтрование производят следующим образом: сначала на фильтр наливают только несколько миллилитров жидкости, так чтобы заполнить нижнюю двойную часть фильтра: когда весь фильтр пропитается жидкостью, на него сливают все содержимое колбочки и накрывают часовым стеклом. Фильтрат должен быть совершенно прозрачным.

Если окраска не изменяется так, как указано выше, то это обычно означает, что было взято слишком много оксалата для стабилизации крови. Чтобы спасти анализ, можно прибавлять к смеси по каплям 10%-ный раствор серной кислоты, каждый раз встряхивая жидкость до прекращения пенообразования и появления шоколадной окраски; необходимо, однако, помнить, что избыточная кислотность фильтрата может повредить дальнейшему исследованию.

---

[1] В дальнейшем изложении под термином «вода» всегда подразумевается дистиллированная вода.

Если для осаждения белка берут небольшие количества крови (0,1—0,2 *мл*), то фильтрование обычно заменяют центрифугированием.

Для получения больших количеств фильтрата можно видоизменить описанный выше способ следующим образом:

а) к одному объему крови прибавляют медленно, при постоянном размешивании, 8 объемов 1/12 н. раствора серной кислоты, затем добавляют 1 объем 10%-ного раствора вольфрамовокислого натрия, продолжая размешивать, тщательно взбалтывают и фильтруют;

б) к 1 объему крови прибавляют 9 объемов смеси, состоящей из 8 объемов раствора серной кислоты 1/12 н. и 1 объема 10%-ного раствора вольфрамовокислого натрия; тщательно разбалтывают и фильтруют.

При осаждении белков плазмы или сыворотки крови довольствуются половинными количествами растворов серной кислоты и вольфрамовокислого натрия, заменяя недостающий объем водой.

Раствор вольфрамовокислого натрия должен быть почти нейтральным на фенолфталеин, что определяют в отдельной пробе; при необходимости нейтрализации к раствору добавляют нужное количество 0,1 н. раствора соляной кислоты или 0,1 н. раствора едкого натра.

Осаждение белков крови трихлоруксусной кислотой. В колбочку отмеряют 1 объем 5- или 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты и медленно, при постоянном помешивании, приливают равный объем крови. Смесь размешивают стеклянной палочкой и фильтруют или центрифугируют.

Трихлоруксусный фильтрат крови (или сыворотки) имеет резко кислую реакцию. В случае надобности трихлоруксусную кислоту можно удалить из фильтрата кипячением.

Осаждение белков крови фосфорномолибденовой кислотой. Для осаждения белков на один объем крови берут 10 объемов реактива, приготовленного следующим образом: в 75 *мл* воды растворяют 5 *г* безводного сульфата натрия и 5 *г* фосфорномолибденовокислого натрия, после чего добавляют 5—6 капель 33%-ного раствора едкого натра, кипятят 20 мин., переливают жидкость в мерную колбу емкостью 1 *л*, прибавляют 15 *мл* концентрированной кислоты, затем 0,25 *г* глюкозы и доливают водой до метки. Метод особенно пригоден, если в дальнейшем сжигают фильтрат с серной кислотой, так как фосфорномолибденовокислый натрий катализирует сжигание.

Можно готовить реактив и другим способом: к 10 *г* чистой (не содержащей NH_3) молибденовой кислоты в колбе приливают 50 *мл* 1 н. раствора едкого натра, кипятят в течение 3—5 мин., прибавляют 150 *мл* воды, фильтруют горячий раствор в мерную колбу емкостью 1 *л*, добавляют к фильтрату 80 *г* вольфрамата натрия, растворенного в 600 *мл* воды, и доливают водой до метки. Осаждение белков ведут, как описано выше, для чего один объем крови разводят 7 объемами воды, прибавляют один объем реактива и один объем 0,62 н. раствора серной кислоты, после чего фильтруют или центрифугируют.

Приготовление безбелковых вытяжек из органов и тканей

Получение вольфрамовокислой вытяжки. Быстро вырезанный, очищенный от посторонних тканей и отмытый от крови орган замораживают тотчас после взятия и измельчают в охлажденной мясорубке, так чтобы получить порошкообразную замороженную массу. Определенную навеску измельченной ткани (0,5—1 *г*) разбалтывают в 8 объемах холодного 1/12 н. раствора серной кислоты, оставляют на 3 мин., прибавляют один объем холодного 10%-ного раствора вольфрамовокислого натрия, затем 1—3 *г* промытого и прокаленного песка, энергично встряхивают в течение 20—30 мин. и фильтруют через мелкопористый фильтр. Если определение производят не тотчас же, то фильтрат (слегка кислый по метилроту) обычно можно сохранять несколько дней в леднике с добавлением нескольких капель толуола.

Можно приготовить и трихлоруксусную вытяжку из ткани. Эта вытяжка, однако, малопригодна для количественного определения мочевой кислоты. Кроме

того, фосфорнокислый кальций, растворяющийся в сильнокислом растворе, дает при нейтрализации осадки, мешающие определению. При стоянии сильнокислого раствора наблюдается (даже в леднике) медленный переход креатина в креатинин.

Для приготовления вытяжки ткань растирают с несколькими объемами 10—20%-ной трихлоруксусной кислоты. Лучшие результаты дает следующий способ: навеску ткани в 3—5 *г* измельчают ножницами и заливают в цилиндре 25 *мл* воды. В цилиндр бросают десяток стеклянных бусинок, энергично встряхивают в течение 10 мин., оставляют на 30 мин., добавляют 25 *мл* 20%-ной трихлоруксусной кислоты, еще раз встряхивают в продолжение 10 мин., ставят на 3 часа в ледник и затем фильтруют. Для анализа берут часть фильтрата и полученный результат пересчитывают на общий объем вытяжки (50 *мл* + вода взятой навески) и на сухой вес ткани. Сухой вес ткани определяют высушиванием определенной навески ее до постоянного веса при 105°. Сушку начинают при более низкой температуре (30—80°), которую затем постепенно повышают (если начать сушку сразу при 100° и выше, то на поверхности ткани образуется плотная корочка, препятствующая удалению влаги).

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА И ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ[1]

Вещество	Цельная кровь	Плазма	Сыворотка	Эритроциты
Химический состав крови человека [2]				
Азот и белковые вещества				
Альбумины, абсолютное количество, %		4,0—4,8 (4,42)		
Альбумины, % от общего количества белков		50,1		
Белки, *г* на 100 *мл*, общее количество	20,5 (19,8—23,8)	7,41		36,8
Белки, *г* на 100 *мл*:				
фибриноген	0,27			
некоагулирующие белки	0,001			
иммуногенный γ-глобулин	0,74			
изоагглютинин	0,002			
ферменты	0,001			
β-псевдоглобулин	0,17			
гликопротеиды	0,08			
липопротеиды	0,04			
белки, связанные с билирубином	0,03			
альбумины	3,35			
Белки, электрофоретические фракции в процентах от общего количества белков:				
альбумины		55,0—60,3;		
α_1-глобулины		4,6—6,2		
α_2-глобулины		5,9—9,2		
β-глобулины		11,1—13,6		
γ-глобулин		10,8—14,7		
фибриноген		3,2—7,0		

[1] В тех случаях, когда нет специальных указаний в тексте, содержание веществ дается в *мг* на 100 *мл*.

[2] Частично по В. С. Асатиани. Биологические таблицы, ч. I. Тбилиси, изд. АН ГССР, 1960, а также по неопубликованным данным лаборатории автора. Относительно более детализированных сведений о химическом составе жидкостей и тканей организма животных и растений см. В. С. Асатиани. Биологические таблицы, ч. I, 1960; ч. II, 1961; ч. III, 1962. Тбилиси, изд. АН ГССР, а также: E. Albritton. Standard Values of Blood. Lond., Saunders Comp., 1952; E. Albritton. Standard Values in Nutrition. Lond., Saunders Comp., 1955; H. Rauen. Biochemisches Taschenbuch, 2, Aufl. Springer Verlag, Berl., 1964.

Продолжение

Вещество	Цельная кровь	Плазма	Сыворотка	Эритроциты
Белки, электрофоретические фракции, *г* на 100 *мл*:				
альбумин		4,04		
α_1-глобулин		0,31		
α_2-глобулин		0,48		
β-глобулин		0,81		
γ-глобулин		0,74		
фибриноген		0,34		
общее количество		6,72		
Белковые фракции плазмы, *г* на 100 *г* белков плазмы:				
глобулин, не растворимый на холоду		0,15		
фибриноген		4		
γ-глобулин		11		
Антитоксин дифтерийный		0,001		
β-Липопротеид		5		
β_1-Эйглобулины с низким содержанием липидов		0,3		
Церулоплазмин		0,6		
Изоагглютинины		0,03		
Протромбин		0,1		
Комплемент		0,4		
Плазминоген		Следы		
Плазмин		»		
β-глобулины		3		
α-липопротеиды		3		
Тиреотропный гормон		Следы		
α-гликопротеиды		1,2		
α-мукопротеиды		0,5		
Холинэстераза		0,005		
Фосфатаза щелочная		Следы		
Йодглобулин		»		
Белок (β_1), связывающий металлы		3		
Альбумин сывороточный		52		
Меркаптальбумин		34		
α_1-глобулин		0,05		
α_2-белок		0,1		
β_1-белок		0,05		
Глюкопротеид кислый		0,5		
Гаптоглобулин, усл. ед.		0,20—0,90		
Гемоглобин, %	14,0—16,1	Следы		33,5 (30—40)

Вещество	Цельная кровь	Плазма	Сыворотка	[illegible]
Глобин свободный (не связанный в гемоглобине)		0,0—2,0		
Глобулины, *г* на 100 *мл*		2,5 (1,8—3,3)	2,9	
Гликопротеиды		80,0		
Липопротеиды		40,0		
Мукопротеиды (см. также Гликопротеиды)			86,7	
Отношение альбумин/глобулин		1,3—33 (1,7)		
Фибриноген		0,2—0,4 (0,29)		
Небелковый азот				
Адениловая кислота	1,2—3,7			
Аденозин		1,09		
Аденозинтрифосфорная кислота (АТФ)	31—57 (44) Мужчины 38—54 (46) Женщины 30—48 (39)			
Азот аминокислот		5,0—8,0		
Азот небелковый	29—43			
Азот полипептидов	3,39	1,77		5,53
Аланин	2,8—5,2 (4,0)	2,6—5,3 (4,0)		2,5—5,6 (4,0)
Аммиак	0,18 (0,12—0,24)			
Аргинин	0,6—1,7 (1,0)	1,1—3,5 (2,3)		0,1—0,6 (0,3)
Аспарагиновая кислота		0,0—1,2		
Билирубин	0,18 (0,12—0,24)			
Валин	2,4 (2,0—2,9)	3,3 (2,5—4,2)		2,0 (1,6—2,5)
Гистидин	0,9—1,7 (1,3)	1,1—1,8 (1,4)		0,8—1,6 (1,1)
Глицин	1,8—2,5	1,3—2,3 (1,8)		1,6—3,1 (2,4)
Глюкозамин		63—88 (77)	Взрослые 61—78 (67) Пожилые 70—89 (81) Дети 52—69 (63)	
Глютамин	4,6—10,6			

Вещество	Цельная кровь	Плазма	Сыворотка	Эритроциты
Глютаминовая кислота, *мг* аминного азота на 100 *мл*		Мужчины 0,7—2,0 (1,2) Женщины 0,5—1,8 (1,0)		
Глютатион общий	29,1—41,7 (36,2)			
восстановленный	25,2—37,7 (31,6)			
окисленный	2,2—10,7 (5,3)			
Гуанидин			0,07—0,58	
Гуанидинуксусная кислота		0,26 (0,24—0,26)		
Изолейцин	0,9—1,5 (1,3)	1,2—1,5		0,5—1,4 (0,9)
Индикан		0,025—0,082		
Креатин	2,9—4,9 (3,9)		2,5—3,0	6,0—10,2(8,1)
Креатинин общий	1,0—2,0 (1,5)	0,87—0,95 (0,91)	0,7—1,1 (0,9)	1,7—1,9 (1,8)
Лейцин	1,4—2,0 (1,7)	1,3—2,5 (1,9)		1,0—1,8 (1,5)
Лизин	1,3—3,0 (2,2)	2,1—3,8 (3,0)		0,9—1,8 (1,4)
Метионин свободный	0,05 (0,4—0,6)	0,25—1,0		0,5 (0,3—0,8)
Мочевая кислота	3,2 (2,2—4,2)	3,8 (2,0—5,6)	4,4(4,0—4,8)	1,9 (0,8—3,0)
Мочевина	30—45 (36)	28—40 (34)		25—39 (30)
Нуклеотиды	31—52 (41)			
Полипептиды	7		5,12	
Пролин		1,5—5,7		
Пурин, общее количество	8,8—11,8 (10,5)			
Рибонуклеиновая кислота	64 (48—79)	4,9 (3,9—5,9)		135 (100—170)
Серин		0,3—2,0		
Тирозин	1,1 (0,8—1,4)	1,5 (0,9—2,4)		1,1 (0,7—1,5)
Треонин	1,6 (1,3—2,0)	2,1 (0,9—3,6)		1,6 (1,3—2,1)
Триптофан	0,7 (0,5—1,0)	0,9—3,0		0,24 (0,2—0,4)
Фенилаланин	1,0 (0,8—1,2)	2,5 (1,1—4,0)		1,0 (0,7—1,3)
Цистин	0,6—1,2 (0,9)	1,8—5,0 (3,4)		0,3—0,5 (0,4)

Вещество	Цельная кровь	Плазма	Сыворотка	Эритроциты
Цитруллин		0,50 (0,39—0,59)		
Эрготионеин	1,8—4,4			
Углеводы				
Гексуронаты, *мг* глюкуроновой кислоты на 100 *мл*	4,1—9,3 (6,7)	0,4—1,4 (0,8)		0,6
Гепариноподобные вещества (мукоитин — серная кислота) в пересчете на гепарин		0,02—0,54		
Гликоген	7,5—11,7 (9,6)			
Глюкоза	90 (80—100)	97 (62—130)		74 (46—102)
Глюкозамин	70 (60—82)		67(61—78)	
Глюкуроновая кислота	10—25			
Мукополисахариды		200		
Пентозы		2,5		
Редукция остаточная (*мг*% глюкозы)	25 —30			
Сахар «истинный» (сбраживаемый)	55—85			
Фруктоза	0,5—5,0			
Фукоза			7,7	
Липиды				
Ацетальфосфатид			Женщины 2,71 Мужчины 2,38	
β-оксимасляная кислота	1,8—2,2			
Жир нейтральный	135 (85—235)	140 (24—260)	245 (175—325)	93 (11—150)
Жирные кислоты, общее количество, *м-экв* жирных кислот на 1 *л*		7,3—36,9 (1,2,3)		
Жирные кислоты	300	315 (295—340)		
Кефалин	65,0	7,0—9,0		210
Летучие жирные кислоты (в виде уксусной кислоты)	1,8			
Лецитин	115	117	50—204 (107)	70
Липиды, общее количество	397—722 (559)	385—675 (530)		411—781 (596)
Сфингомиэлен	186	41—56		70

Вещество	Цельная кровь	Плазма	Сыворотка	Эритроциты
Фосфолипиды	186—310 (247)	110—220 (165)		280—420 (350)
Холестерин общий	120—210	195—235	130—225	175
Холестерин, эфиры		146	121—125	
Холин общий		26,35		
Холин свободный	1,0—4,0 (2,5)	0,05—2,5		4,4—7,5
Цереброзиды				50,0
Органические кислоты, спирты, альдегиды, кетоны				
Алкоголь этиловый	0,0—4,0			
α-кетокислоты в виде пировиноградной кислоты	0,0—3,1 (1,3)			
Ацетальдегид (уксусный альдегид)	0,32—0,50			
Ацетоин (ацетилметилкарбинол)	0,01			
Ацетон	0,01	0,01		
Ацетоуксусная кислота	0,51—2,6	0,8—2,8		
Глицеринофосфорная кислота	21,3			
Дифосфоглицериновая кислота				11—14
Дезоксихолевая кислота		Мужчины 25—45 (35) Женщины 32—52 (42)		
Желчные кислоты (в виде холевой кислоты)		0,2—3,0		
Лимонная кислота	1,33—2,58 (1,9)	1,4—3,0 (2,2)		0,65—1,34 (10)
Малоновая кислота	0,24—0,75			
Молочная кислота	19 (0,0—41)	36		12
Муравьиная кислота	2—4,8			
Нейраминовая (сиаловая) кислота			Женщины 43—63 Мужчины 38—57	
Органические кислоты, *м-экв* на 1 *л*		Свободные — 1,5 Связанные — 0,2	0,5—2,0	
Фенолы				
Фумаровая кислота	>0,3	Следы		
Холевая кислота	0,2—3,0			
Щавелевая кислота	0,9—1,5		0,2	
Яблочная кислота		0,1—0,9 (0,5)		
Янтарная кислота		0,5		

Вещество	Цельная кровь	Плазма	Сыворотка	Эритроциты
Пигменты				
Билирубин	0,1—0,25 (0,18)			
Гемоглобин, *г* на 100 *мл*	14,9	0,001—0,005		30—40
Протопорфирин, «свободный протопорфирин эритроцитов», *мкг* на 100 *мл*				13,0—139,0
Уробилин			>0,05—0,28	
Витамины				
Аскорбиновая кислота (витамин С)	0,2—0,7 (0,62)	0,1—2,5 (0,7)		0,5—2,8 (1,0)
Биотин, *мкг* на 100 *мл*	0,8—1,7 (1,23)	1,0—1,7 (1,3)		
Витамин А, *мкг* на 100 *мл*	120 (20—300)			
Витамин B_1 (см. Тиамин), *мкг* на 100 *мл*				
Витамин B_2, *мкг* на 100 *мл*	15—60	2,6—3,7 (2,3)		18—26 (22)
Витамин B_6, *мкг* на 100 *мл*	35,0—80,0			
Витамин B_{12} (цианкобаламин), *мкг* на 100 *мл*	0,06—0,14 (0,08)			
Витамин D, *мкг* на 100 *мл*	1,2 (0,9—1,9)			
Витамин E		0,9—1,9 (1,2)		
Витамин PP (см. Никотиновая кислота)				
Каротин	0,005—0,150			
Никотиновая кислота	0,6 (0,2—0,9)			1,3
Пантотеновая кислота, *мкг* на 100 *мл*	15,45 (30)	6—35 (15)		15—30 (25)
Парааминобензойная кислота, *мкг* на 100 *мл*	3,4			
Тиамин	8,0 (4,0—11,0)	7,0 (1,0—9,0)		8,0 (7,0—10,0)
Токоферолы	0,5—1,8	0,5—1,8		
Фолиевая кислота, *мкг* на 100 *мл*	3,5 (2,3—5,3)	1,7 (1,5—5,0)		
Холин, общее количество		30 (26—35)		
Холин свободный	2,5 (1—4,0)	0,05—2,5		6,0 (4,4—7,5)
Гормоны и другие биологические активаторы				
Адреналин, *мкг* на 100 *мл*		4,0—9,6		
Адренокортикотропный гормон, *мкг* на 100 *мл*	>0,5			

Продолжение

Вещество	Цельная кровь	Плазма	Сыворотка	Эритроциты
Андроген, *мкг* тестостерона на 100 *мл*		2,2—3,4 (2,8)		
Андростерон, *мкг* на 100 *мл*	15			
Ацетилхолин, *мкг* на 100 *мл*		6,6—8,6		
Гистамин, *мкг* на 100 *мл*	6,7—8,6			
Гормон щитовидной железы, *мкг* йода, связанного с белком, на 100 *мл*		4—8 (5)		
Дегидроэпандростерон, *мкг* на 100 *мл*	2,0—25,0			
Инсулин после еды, *мкг* на 100 *мл*	0,8			
Кортизол, *мкг* на 100 *мл*		2—23 (14)		
17-окси-кортикостероиды		8,0—18,2 (10,8)		
Норадреналин, *мкг* на 100 *мл*		0,02—0,4		
Минеральные вещества (включая микроэлементы)				
Алюминий, *мкг* на 100 *мл*	5—40 (15)	10—88 (46)	10—88 (46)	3—17 (7)
Аммиак	0,18 (0,12—0,24)		0,2—1,1	
Бикарбонаты, *м-экв* на 1 *л*	19,1—22,7 (20,9)	. . .	Мужчины 24—31 (27) Женщины 24—29 (26)	
Бром, *мкг* на 100 *мл*	0,33—1,73			. . .
Железо, общее количество	48 (43—52)	0,032—0,177 (0,105)	0,08—0,15	
Йод, *мкг* на 100 *мл*	3,13 (7,7)		4,8—8,6 (7,1)	
Йод, связанный с белками, *мкг* на 100 *мл*	4,0—8,5 (6,0)	. . .		.
Кадмий, *мг* на 100 *г* сухого остатка	0,001			
Калий, *м-экв* на 1 *л*	39—62 (48)	3,1—6,4 (4,7)	3,6—4,8 (4,2)	89—101 (95)
Кальций, *м-экв* на 1 *л*	4,8	4,3—52 (4,8)	0,6—1,4	
Кобальт, *мкг* на 100 *мл*	3,0—7,0	0,39—1,48		
Кремний, *мкг* на 100 *мл*	140—295 (235)		220—570 (350)	
Литий, *мкг* на 100 *мл*		1,5		0,4
Магний, *м-экв* на 1 *л*	3,0—3,7 (3,2)	1,7—1,9 (1,8)		1,6—6,7 (5,1)
Марганец, *мкг* на 100 *мл*	0,0—25,0 (13,0)	0,0—19,0 (8,0)		0,0—48,0 (19,0)

Продолжение

Вещество	Цельная кровь	Плазма	Сыворотка	Эритроциты
Медь, *мкг* на 100 *мл*	72—125 (98)	75—154 (109)		71—160 (115)
Мышьяк, *мкг* на 100 *мл*	0,008			
Натрий, *м-экв* на 1 *л*	72—91 (83)	140—155 (138)	143	10,0
Олово, *мкг* на 100 *мл*	22 (5—40)	4 (2—10)		26 (7—64)
Роданат (тиоцианат)	0,5—1,4 (0,77)			
Ртуть, *мкг* на 100 *мл*	0,2			
Рубидий	0,2—0,4			
Свинец, *мкг* на 100 *мл*	18—49 (29)	2,0—7,8 (2,9)		29—86 (57)
Сера, небелковая общая, *мг/мл*		338 (2,95—3,75)		
Сера нейтральная		1,42 (0,90—1,95)		
Сера неорганических сульфатов		0,9—1,1	0,5—1,2	
Сера общая		90—120		
Стронций, *мг* на 100 *г* сухого остатка		0,025		
Титан, *мг* на 100 *г* сухого остатка	0,0125	0,0140		0,0035
Фосфаты липидные (в виде P)		7,0—10,0		
Фосфаты неорганические		2,0—3,0		
Фосфаты, эфиры		1,0—2,0		
Фосфор аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ), *мг* P на 100 *мл*	5,1—10,4 (8,1)			14,3—24,0 (18,2)
Фосфор липидный, *мг* P на 100 *мл*	11,2	2,6—14,2 (7,9)	8,2	14,8
Фосфор неорганический	2,1—3,8 (2,9)	2,4—4,4 (3,2)		0,91—3,3 (2,4)
Фосфор нуклеотидный, *мкг* на 100 *мл*	2,2—3,4 (2,8)			5,1—7,1 (6,2)
Фосфор общий, кислоторастворимый, *мкг* на 100 *мл*	19			
Фосфор органический (кислоторастворимый)	18,6—29 (23,1)	19—29 (23)		39—59 (50)
Фтор (фториды), *мкг* на 100 *мл*	11—45 (28)	10—45 (28)		11—44 (27)
Хлориды, *м-экв* на 1 *л*	71—87 (82)	93—110 (102)	Мужчины 97—105 (101) Женщины 99—108 (103)	Мужчины 72—83 (78) Женщины 75—84 (79)
Хром	0,0035—0,012	0,014		0,020

Продолжение

Вещество	Цельная кровь	Плазма	Сыворотка	Эритроциты
Цинк, *мкг* на 100 *мл*	488—1272 (880)	0,0—615 (300)	125	911—1969 (1440)
Вода и сухой остаток				
Вода	83 (81—86)	94 (93—95)	94 (93—95)	72 (70—75)
Зола	1,09	0,93		1,24
Сухой остаток, %	15,25	9—10		32—43
Физические, физико-химические и другие показатели				
Вязкость по Гессу	Мужчины 3,4—5,7 (4,7) Женщины 3,7—4,9 (4,5)	1,8	1,5	
Депрессия, °C		0,56—0,57		0,55—0,61

Химический состав крови обезьяны

Вещество	Цельная кровь	Плазма	Сыворотка	Эритроциты
Азот и белковые вещества				
Азот общий, *мг* на 100 *г*	23,31			
Белки, электрофоретические фракции, % от общего количества белка:				
предальбумин		0,5		
альбумин		50,0		
глобулины: α_1		5,5		
α_2		5,2		
α_3		4,2		
β		16,1		
γ		9,0		
Небелковые азотсодержащие вещества				
АТФ, *мг* Р на 100 *мл*	5,0			12,0
Азот остаточный, *мг* на 100 *г*	16,7			
Аминокислоты, *мг* на 100 *г*	5,8			
Креатинин, *мг* на 100 *г*	1,4			
Мочевина, *мг* на 100 *г*	16,4			
Мочевая кислота, *мг* на 100 *г*	0,4			
Нуклеотиды, *мг* азота на 100 *мл*	1,2			3,7
Углеводы				
Глюкоза, *мг* на 100 *г*	90—120			

Вещество	Цельная кровь	Плазма	Сыворотка	Эритроциты
Липиды				
Дифосфоглицерат, *мг* P на 100 *мл*	13,0			31
Холестерин, *мг* на 100 *г*	120—160			
Пигменты				
Гемоглобин, *г* на 100 *мл* крови	13,0			
Ферменты				
Ангидраза угольная, усл. ед.	1,1—1,9			
Фосфатаза щелочная, ед. Бодански		3,1—9,7		
Фосфатаза кислая, ед. Кинг-Армстронг		1,2—3,8		
Витамины				
Аскорбиновая кислота, *мг* на 100 *г*	0,7—1,1			
Витамин B_1 (тиамин), *мкг* на 100 *г*	16—25			
Витамин B_2 (рибофлавин), *мкг* на 100 *г*	7—12			
Пиридоксин (витамин B_6), *мкг* на 100 *мл*	11,0 (5,0—20,0)	8,0 (1,0—18,0)		5,0 (2,0—21,0)
Гормоны и другие биологические активаторы				
Адреналин, *мкг* на 100 *г*	0,0—35,0			
Дегидроадреналин, *мкг* на 100 *г*	0,0—18			
Прогестерон, *мкг* на 100 *мл* (лютеальная фаза)		600		
Тироидный гормон, *мкг* йода, связанного с белком		4,0—8,0		
Минеральные вещества				
Бикарбонаты, *мг-экв* на 1000 *мл*			26	
Калий, *мг-экв* на 1000 *мл* . . .	53,0 (46,0—62,0)	6,8 (4,9—8,7)		113 (96—131)
Кальций, *мг* на 100 *г*	9,0—13,2			
Кремний, *мг* на 100 *г*	6,4	21		
Магний, *мг-экв* на 1000 *мл* . .	4,1—4,8	2,1—2,7		5,8—9,9

Химический состав крови собаки

Азот и белковые вещества				
Азот общий, *г* на 100 *г*	2,82—4,04			

Вещество	Цельная кровь	Плазма	Сыворотка	Эритроциты
Белки, электрофоретические фракции, *г* на 100 *г* общего белка: альбумин		39,6		
глобулины: α_1		16,9		
α_2		8,0		
β		13,0		
γ		9,3		
Фибриноген, *г* на 100 *мл*		0,42—0,64		
Небелковый азот				
Азот аминокислот, *мг* на 100 *г*	6,7—8,5			
Азот аммиака, *мг* на 100 *г*	0,22—0,42			
Азот мочевины, *мг* на 100 *г*	10—20			
Азот мочевой кислоты		0,33		
Азот остаточный, *мг* на 100 *г*	22—32			
Азот полипептидов, *мг* на 100 *г*	4,0			
Аланин, *мг* на 100 *г*		1,1—3,0		
Аминокислоты свободные, *мг* на 100 *г*:				
аланин		5,46		
аспарагиновая кислота		0,30		
аргинин		2,91		
цистин		1,95		
глицин		1,78		
глютаминовая кислота		1,61		
гистидин		1,84		
изолейцин		2,06		
лейцин		2,24		
лизин		4,89		
метионин		0,57		
фенилаланин		1,42		
пролин		1,42		
серин		0,91		
триптофан		0,98		
тирозин		0,45		
треонин		0,03		
валин		2,70		
Глютатион, *мг* на 100 *г*:				
общий	37,61			
восстановленный	31,82			
окисленный	5,80			
Карнозин, *мг* на 100 *г*	0,5—0,8			
Креатинин, *мг* на 100 *г*	1,0—1,7			

Продолжение

Вещество	Цельная кровь	Плазма	Сыворотка	Эритроциты
Мочевая кислота, *мг* на 100 *г*	0,33 (0—0,5)			
Углеводы				
Гликоген, *мг* на 100 *г*	3,2—6,5			
Глюкоза, *мг* на 100 *г*	60 (44—78)			
Фруктоза, *мг* на 100 *г*	4,8—5,0			
Липиды				
Жирные кислоты, *г* на 100 *г*	0,065—0,075			
Кефалин		22		
Лецитин, *мг* на 100 *г*	199—205			
Липиды, общее количество		580 (47—725)		
Сфингомиэлин			55	
Холестерин		173 (138—214)		
Холин общий		12—15		
Холин свободный		1,0—1,1		
Органические кислоты, спирты, альдегиды, кетоны				
АТФ	19			35
α-кетоновые кислоты	1,0 (0,7—1,3)			
Ацетон-ацетоуксусная кислота, *мг* на 100 *г*	2,2			
Дифосфоглицериновая кислота			133	
Молочная кислота	19			22,5
Мочевая кислота, *мг* на 100 *г*		0,33		(8,5—32)
Пировиноградная кислота, *мг* на 100 *г*	4,77			
Пигменты				
Гемоглобин, *г* на 100 *мл*	14,8 (11,0—18,0)			
Ферменты				
Альдолаза (по количеству *мм*^{3} CO_2 из фруктозодифосфата, расщепляемого 1 *мл* сыворотки крови) в среднем			15 (12—22)	
Каталаза, ед. по Баху	0,24—0,49			
Угольная ангидраза, ед. по Крепсу	2,00—4,80			
Холинэстераза, *мкмоли* гидролизованного ацетилхолина в минуту на 100 *мл*			112—303	

Продолжение

Вещество	Цельная кровь	Плазма	Сыворотка	Эритроциты
Витамины				
Аскорбиновая кислота, *мг* на 100 *г*	0,5 (0,2—2,1)			0
Витамин A, *мкг* на 100 *мл*	1,5 (0—3)	3 (0—5)		
Витамин B_1, *мкг* на 100 *г*	5,5—9			
Витамин B_{12}, *мкг* на 1 *л*	0,9 (0,5—1,1)			
Витамин D (кальциферол), *мкг* на 100 *мл*		1,4		
Витамин E (токоферол)	0,29—1,1	0,06		
Никотиновая кислота	0,8			1,6
Рибофлавин, *мкг* на 100 *мл*	97 (90—100)			
Гормоны и другие биологические активности				
Кортикостероиды		Самцы—0,27 (0,12—0,38) Самки—0,22 (0,12—0,38)		
Тироидный гормон, *мкг* на 100 *мл*		2,3 (2—4)		
Минеральные вещества				
Алюминий, *г* на 100 *мл*		3,1—4,0		
Бикарбонаты, *мг-экв* на 1000 *мл*		20,5 (18,0—24,0)		
Бром, *мг* на 100 *г*	1,0—1,5			
Железо, *мг* на 100 *г*	58—62			
Йод, общее количество, *мкг* на 100 *мл*			29 (14—52)	
Калий, *мг-экв* на 1000 *мл*	6,0 (4,9—9,6)	4,4 (3,7—5,8)		8,0 (4,2—11,8)
Кальций, *мг-экв* на 1000 *мл*		5,3 (4,7—6,1)	4,9 (4,2—5,6)	
Кремний, *мкг* на 100 *мл*	52			
Магний, *мг-экв* на 1000 *мл*	2,7	1,8 (1,3—2,0)	1,9 (1,4—2,4)	3,7
Натрий, *мг-экв* на 1000 *мл*	127 (116—136)	97 (90—104)		150 (135—160)
Сера неорганическая		3,2		1,35
Фосфаты, *мг-экв* на 1000 *мл*		1,6 (1,3—20)		
Фосфор АТФ	4,8			10,7
Фтор, *мкг* на 100 *мл*		25 (12—35)		17 (9—24)
Хлориды, *мг-экв* на 1000 *мл*	87 (82—91)	106 (99—110)		65 (61—69)

Продолжение

Вещество	Цельная кровь	Плазма	Сыворотка	Эритроциты
Химический состав крови кошки				
Азот и белковые вещества				
Белки, электрофоретические фракции, *г* на 100 *г* общего белка:				
альбумин		41,4		
глобулины: α_1		8,1		
α_2		20,2		
α_3		4,7		
β		8,7		
γ		12,5		
Фибрин, *г* на 100 *г*		0,410		
Небелковый азот				
Азот аминокислот, *мг* на 100 *г*	8,6			
Азот остаточный, *мг* на 100 *г*	25,9—27,9			
Азот аммиачный, *мг* NH_3 на 100 *г*	0,18—0,19			
АТФ	14			52
Глютамин, *мг* на 100 *г*		5,0—10,7		
Глютаминовая кислота		2,1 (1,6—2,8)		
Глютатион восстановленный, *мг* на 100 *г*	31,0			
Глютатион общий, *мг* на 100 *г*	35,5			
Глютатион окисленный	4,4			
Мочевина, *мг* на 100 *г*	3,6—7,3			
Эрготионеин, *мг* на 100 *г*	0,8—1,25			
Углеводы				
Глюкоза	74 (64—84)			
Липиды				
Жир нейтральный		108 (0—245)		
Жирные кислоты, общее количество		288 (56—400)		
Липиды, общее количество		376 (145—607)		
Фосфолипиды		132 (21—243)		
Холестерин		93 (43—143)		
Органические кислоты, спирты, альдегиды, кетоны				
Ацетоновые тела, *мкмоли* на 1 *л*	10—16			
Органические кислоты, *мг-экв* на 1 *л*	10,0—15,2 (до 18)			
Дифосфоглицериновая кислота			17	

Продолжение

Вещество	Цельная кровь	Плазма	Сыворотка	Эритроциты
Пигменты				
Билирубин, *мг* на 100 *г*	0,0—0,65			
Гемоглобин, *г* на 100 *мл*	11,2 (7,0—15,5)			
Ферменты				
Холинэстераза, *мкмоли* гидролизованного ацетилхолина в минуту на 100 *мл*			92—140	
Витамины				
Аскорбиновая кислота, *мг* на 100 *г*	0,79			
Минеральные вещества				
Железо, *г* на 100 *г*	0,046			
Калий, *мг-экв* на 1000 *мл*			4,3	
Магний, *г* на 100 *г*	0,0059			
Медь, *мг* на 100 *г*	0,100			
Натрий, *мг-экв* на 1000 *мл*			151 (147—156)	
Ортофосфорная кислота, *мг* на 100 *г*	4,86		9,6	
Фосфор АТФ	3,8			
Фосфор минеральный, *мг* на 100 *мг*	3,6 (4,6—6,9)			
Фосфор органический, кислоторастворимый	8,3 (7,7—9,1)			20,7 (19,2—22,7)
Хлориды, *мг* на 100 *г*	360,0			

Химический состав крови кролика

Азот и белковые вещества				
Азот общий, *г* на 100 *г*	1,8—2,08			
Белки, общее количество, *г* на 100 *г*			6,5—7,5	
альбумин, *г* на 100 *мл*			4,6 (4,1—5,1)	
глобулин, *г* на 100 *мл*			2,7 (1,9—3,6)	
Белки, электрофоретические фракции, *г* на 100 *г* общего белка:				
альбумин		62,0		
глобулины: α		11,7		
β			13,0	
γ			14,3	

Вещество	Цельная кровь	Плазма	Сыворотка	Эритроциты
Небелковый азот				
Азот мочевины			15,9 (6,0—2,5)	
Азот остаточный, *мг* на 100 *г*	32		29	
Аминоазот, *мг* на 100 *г*	8,23	6,32		12,9
Аммиак, *мг* на 100 *г* (не выше)	0,001—0,003			
Гексозамин, *мг* на 100 *г*	30,0			
Глицин		4,0		
Глютатион, *мг* на 100 *г*:				
общий	35,5—56,4			
восстановленный	34,3—56,5			
окисленный	3,2			
Гуанидин, *мг* на 100 *г*	0,34			
Мочевая кислота			2,6 (1,0—4,3)	
Цистин свободный, *мг* на 100 *г*		0,9—1,1		
Углеводы				
Гликоген, *мг* на 100 *г*	10,0—17,0			
Глюкоза, *мг* на 100 *г*	85 (67—107)			
Пентоза, общее количество, *мг* на 100 *г*		2,9—7,7		
Липиды				
Жир нейтральный, *мг* на 100 *г*	38 (4—155)	105 (7—209)		41 (0,86)
Жирные кислоты, общее количество, *мг* на 100 *г*		169 (40—298)		
Кефалин, *мг* на 100 *г*	160	27		107
Лецитин, *мг* на 100 *г*				36 (65—116)
Сфингомиэлин, *мг* на 100 *г*	42	38		17 (35—59)
Фосфолипиды, *мг* на 100 *г*	145 (93—204)	78 (13—143)		240 (191—289)
Холестерин общий, *мг* на 100 *г*	82 (54—110)	45 (10—80)		133 (115—151)
Холестерин свободный, *мг* на 100 *г*	68 (48—90)	22 (0—48)		133 (115—151)
Холестерин связанный (эфиры холестерина), *мг* на 100 *г*	92 (0—28)	37 (0—49)		0
Холин свободный, *мг* на 100 *г*		0,5		

Продолжение

Вещество	Цельная кровь	Плазма	Сыворотка	Эритроциты
Органические кислоты, спирты, альдегиды, кетоны				
АТФ, *мг* на 100 *г*	54 (44—64)			112
α-кетоновые кислоты, *мг* на 100 *г*	1,0			
Муравьиная кислота, *мг* на 100 *г*	0,14—0,84 (0,52)			
Пировиноградная кислота, *мг* на 100 *г*	0,98	1,9		
Пигменты				
Гемоглобин, *г* на 100 *мл*	11,9 (8,05—15,0)			29 (27—31)
Ферменты				
Аденозиндезаминаза — активность, *мкг* азота в час на 100 *мл*	415			
Альдолаза (по количеству *мм*³ CO_2 из фруктозодифосфата, расщепляемого 1 *мл* сыворотки крови)			В среднем 54	
Амилаза (активность по методу Энгельгардта — Герчук) . . .	0,100—0,175			
Холинэстераза, *мкмоли* гидролизованного ацетилхолина за минуту на 100 *мл*			18—35	
Витамины				
Аскорбиновая кислота, *мг* на 100 *г*	2,0—3,0			0
Витамин A, *мкг* на 100 *г* . . .	25 (15—70)	45 (30—130)		
Витамин B_{12}, *мкг* на 100 *г* . . .	1,01 (0,64—1,50)			
Витамин D, *мкг* на 100 *г*		1,3 (1,1—1,8)		
Пантотеновая кислота, *мкг* на 100 *мл*	20 (15—35)			
Тиамин, *мкг* на 100 *г*	3—30			
Гормоны и другие биологические активаторы				
Адреналин, *мкг* на 100 *г* . . .	0,0—16,0	0,0—12,0		
Ацетилхолин, *мкг* за 1 час 0,1 *мл* гидролизованных эритроцитов				840
Гистамин, *мкг* на 100 *г*	100—500	40		
Прогестерон, *мкг* на 100 *г* . .		600		

Продолжение

Вещество	Цельная кровь	Плазма	Сыворотка	Эритроциты
Минеральные вещества				
Бикарбонаты, *мг-экв* на 100 *мл*			28	
Железо окись, *мг* на 100 *г* . .	43,0			
Йод, *мкг* на 100 *г*	30			
Калий, *мг-экв* на 1000 *мл*		5,1	4,1 (2,7—5,1)	
Кальций, *мг-экв* на 1000 *мл*		7,2		
Кремний, *мкг* на 100 *г*	100	18		
Магний, *мг-экв* на 1000 *мл* . . .	4,4 (3,9—4,5)	2,0		6,0 (5,3—11,2)
Медь, *мкг* на 100 *г*	85 (74—99)			67 (51—86)
Натрий, *мг-экв* на 1000 *мл* . . .		13,6	158 (155—165)	
Свинец, *мкг* на 100 *мл*	39	15		
Сера неорганическая, *мг* на 100 *г*		5,0 (3,6—6,1)		
Сера органическая, *мг* на 100 *г*		1,6 (1,0—2,1)		
Сера общая, *мг* на 100 *г* . .		5,4 (4,0—6,9)		
Фосфаты неорганические			5,9	
Хлориды, *мг-экв* на 1000 *мл* .	33—84	105 (92—112)	100	

Химический состав крови морской свинки

Азот и белковые вещества			
Белки, общее количество, *г* на 100 *мл*			5,4 (5,0—5,6)
альбумин			3,2 (2,8—3,9)
глобулин			2,2 (1,7—2,6)
Белки, электрофоретические фракции, *г* на 100 *г* общего белка:			
альбумин		54,6	
глобулины: α_1		4,0	
α_2		3,7	
α_3		15,2	
β		8,8	
γ		5,6	

Вещество	Цельная кровь	Плазма	Сыворотка	Эритроциты
Небелковый азот				
Азот небелковый		39 (30—51)		
Аминоазот, *мг* на 100 *г*	7,29—9,3	5,27—9,4		
Глицин свободный		2,5		
Мочевая кислота			2,5 (1,3—5,6)	
Мочевина, азот мочевины	19 (8—29)			
Углеводы				
Гликоген, *мг* на 100 *г*	13,4—48,7			
Глюкоза	96 (82—107)			53
Фруктоза, *мг* на 100 *г*	8,2—9,3			
Липиды				
Жир нейтральный		73 (0—145)		
Жирные кислоты, общее количество		116 (92—140)		
Фосфолипиды		51 (25—77)		
Холестерин		11 (7—15)		
Органические кислоты, спирты, альдегиды, кетоны				
Ацетоуксусная кислота, *мкг* на 1 *мл*	1,4—2,3			
Пировиноградная кислота		2,3		
Уксусная кислота, *мг* на 100 *г*	8,2—12,0			
Пигменты				
Гемоглобин, *г* на 100 *мл*	14,4 (11—16,5)			34 (33—35)
Ферменты				
Альдолаза (по количеству *мм*^{3} CO_2 из фруктозодифосфата, расщепляемого 1 *мл* сыворотки крови, в среднем)			42 (17—65)	
Кокарбоксилаза, *мкг* на 100 *мл*	45—80			
Угольная ангидраза, *мкг* на 100 *мл*	0,72—1,4			
Холинэстераза, *мкмоли* гидролизованного ацетилхолина в минуту на 100 *мл*			125—230	
Витамины				
Никотиновая кислота	6,5—8,9			
Тиамин, *мкг* на 100 *мл*	45—80			

Вещество	Цельная кровь	Плазма	Сыворотка	Эритроциты
Гормоны и другие биологические активаторы				
Гистамин, *мкг* на 1 *мл*	0,06—0,8			
Тироидный гормон, *мкг* на 100 *мл*		2—2,5		
Минеральные вещества				
Железо, *мг* на 100 *г*	49,0			
Йод общий (йодиды), *мкг* на 100 *мл*			7,3	
Калий, *мг-экв* на 1000 *мл* . . .			7,4 (6,8—8,9)	
Кальций, *мг-экв* на 1000 *мл* . . .		5,3 (3,7—6,8)	4,4—6,2	
Магний, *мг-экв* на 1000 *мл* . .	5,6		4,0	8,1
Медь, *мг* на 100 *г*			0,06—0,12	
Натрий, *мг-экв* на 1000 *мл* . . .			145 (140—150)	
Фосфор АТФ	5,8			13,7
Фосфор дифосфоглицериновой кислоты	13,1			31
Фосфор неорганический	4,4 (2,6—5,7)			
Хлориды, *мг-экв* на 100 *мл* . . .		105 (98—115)		
Цинк, *мг* на 100 *г*		0,338		

Химический состав крови крысы

Азот и белковые вещества				
Альбумин/глобулин, отношение		1,15		
Белки, общее количество, *г* на 100 *мл*		6,3		
альбумин		3,4—4,3		
глобулин		1,8—2,5		
Белки, электрофоретические фракции, *г* на 100 *г* общего белка:				
альбумин		59,1		
глобулины: α		15,4		
γ		4,8		
предальбуминовая фракция . .		1,3		
Фибриноген, *г* на 100 *мл* . . .		0,16—0,34		
Небелковый азот				
АТФ	38			77

Продолжение

Вещество	Цельная кровь	Плазма	Сыворотка	Эритроциты
Азот мочевины			12,9 (9,6—16,3)	
β-Аланин, *мг* на 100 *г*	0,9			
Аллантоин, *мг* на 100 *г*		0,6—3,2		
Аргинин свободный		3,9 (2,7—4,9)		
Валин свободный		2,6 (1,5—3,6)		
Гистидин свободный		1,2 (0,9—1,5)		
Глицин свободный		3,1 (1,5—4,6)		
Глютатион восстановленный	40 (30—45)			
Изолейцин свободный		1,4 (0,7—2,3)		
Креатинин, *мг* на 100 *г*		0,90		
Лейцин свободный		2,1 (11—3,1)		
Лизин свободный		7,2 (4,0—10,4)		
Метионин свободный		1,0 (0,6—1,3)		
Мочевина, азот, *мг* на 100 *г*	22,0			
Мочевая кислота, *мг* на 100 *г*			2,5 (1,8—3,0)	
Пролин свободный		3,6 (3,3—3,9)		
Тирозин свободный		1,5 (0,8—2,2)		
Треонин свободный		4,2 (2,3—6,2)		
Флавинадениндинуклеотид, *мкг* на 100 *мл*	50—65			
Цистин свободный		0,7—0,9		
Эрготионеин, *мг* на 100 *мл*	1,3—3,1			
Углеводы				
Гексуронат (гексуроновая кислота)		0,9 (0,5—1,3)		0,4
Гликоген, *мг* на 100 *г*	1,23—3,70			
Глюкоза	66 (56—76)			
Липиды				
Жир нейтральный		85 (26—144)		
Жирные кислоты, общее количество		153 (108—198)		
Липиды, общее количество		230 (70—415)		
Холестерин		52 (28—76)		
Холестерин свободный		21 (5—37)		
Холин свободный		0,05—0,3		

Продолжение

Вещество	Цельная кровь	Плазма	Сыворотка	Эритроциты
Органические кислоты, спирты, альдегиды, кетоны				
α-кетоновые кислоты	1,1			
АТФ				77
Ацетон, *мг* на 100 *г*	10—30			
Ацетоуксусная кислота, *мг* на 100 *г*	0,23—0,45	0,41—0,84		
Дифосфоглицериновая кислота .		146		
Желчные кислоты, *мг* на 100 *г* .		2,9		
Пировиноградная кислота . . .		1,1		
Уксусная кислота, *мг* на 100 *г*	6,1—12,0			
Фумаровая кислота	15,0			
Пигменты				
Гемоглобин, *г* на 100 *мл*	14,8 (12—17,5)			32 (30—35)
Ферменты				
Альдолаза (по количеству $мм^3$ CO_2 из фруктозодифосфата, расщепляемого 1 *мл* сыворотки крови)			44 (28—65)	
Дезаминаза адениловой кислоты, усл. ед.	41			
Рибонуклеиназа, активность, $мм^3$ CO_2 (из бикарбоната) в 1 *г*	84—204	30—84		36—84
Холинэстераза, *мкмоли* гидролизованного ацетилхолина в минуту на 100 *мл*				253
Витамины				
Аскорбиновая кислота	0,5 (0,1—1,5)	0,5 (0,05—1,5)		
Биотин, *мкг* на 100 *мл*	1,5—3,5			
Витамин А, *мкг* на 100 *мл* . .	6 (4—70)	10 (6—12)		0
Витамин B_{12}, *мкг* на 100 *мл* . .	0,08 (0,05—0,12)			
Витамин Е		0,05—0,06		
Никотиновая кислота	1,4 (1,2—1,8)			
Рибофлавин, *мкг* на 100 *мл* . .	45 (20—65)			100—130
(Витамин B_1) тиамин, *мкг* на 100 *мл*	20,5 (10—25)			
Минеральные вещества				
Алюминий, *мг* на 100 *г*	0,06			

Вещество	Цельная кровь	Плазма	Сыворотка	Эритроциты
Бикарбонаты, *мг-экв* на 1000 *мл*		22,4	20,9 (16,1—25,3)	
Железо, *мкг* на 100 *мл*		26,1		
Йод общий, *мкг* на 100 *мл* . . .		3,4 (3,3—3,5)		
Калий, *мг-экв* на 1000 *мл* . . .		5,9 (5,4—6,4)	5,1 (4,8—5,4)	
Кальций, *мг* на 100 *г*		8—11	9—11	
Магний, *мг-экв* на 1000 *мл* . . .	4,8 (3,7—5,8)	2,9 (2,0—3,7)	2,6 (2,4—2,8)	7,1 (5,8—8,4)
Марганец, *мкг* на 100 *мл* . . .	17			
Медь, *мкг* на 100 *мл*	60—80			
Натрий, *мг-экв* на 1 *кг*			151 (143—156)	
Резервная щелочность, об. %. .	59,7			
Сульфаты неорганические . . .	3,0			
Сульфгидрильные группы (амперометрическое титрование), *мкмоли* на 100 *мл*		39,9—42,9 (±2,3)		194 (±2,6)
Фосфаты, *мг-экв* на 1000 *мл* . .		7,0 (5,8—8,2)		
Хлориды, *мг-экв* на 1000 *мл* . .			110 (105—117)	
Цинк, *мг* на 100 *г*				1,0

Химический состав крови мыши

Азот и белковые вещества				
Азот общий, *мг* на 100 *г*	3,48 (0,12)			
Белки, *г* на 100 *мл*:				
альбумин			2,42	
глобулины α_1			0,51	
α_2			1,04	
β			1,67	
γ			0,95	
общий белок			6,6	
альбумин/глобулин			0,58	
Небелковый азот				
Аланин свободный		5,9 (5,3—6,6)		
Аргинин свободный		4,3 (3,8—5,0)		
Гистидин свободный		1,6 (1,4—1,7)		
Глицин свободный		1,9 (1,7—2,3)		

Вещество	Цельная кровь	Плазма	Сыворотка	Эритроциты
Глютаминовая кислота свободная		3,3 (2,9—3,6)		
Изолейцин свободный		2,4 (2,2—2,8)		
Лизин свободный		6,4 (5,7—7,0)		
Метионин свободный		1,9 (1,7—2,2)		
Пролин свободный		1,8 (1,6—2,1)		
Тирозин свободный		2,5 (2,4—2,7)		
Треонин свободный		3,5 (3,0—3,9)		
Триптофан свободный		2,1 (1,5—2,6)		
Фенилаланин свободный		2,4 (2,0—3,2)		
Углеводы				
Глюкоза	109 (75—143)			
Липиды				
Холестерин	180 (149—244)			
Органические кислоты, спирты, альдегиды, кетоны				
Ацетоуксусная кислота, *мкг* на 1 *мл*	2,45—68	2,65—7,4		
Пигменты				
Гемоглобин, *г* на 100 *мл*	14,8 (10—12)			36 (33—39)
Ферменты				
Альдолаза (по количеству *мм*^{3} CO_2 из фруктозодифосфата, расщепляемого 1 *мл* сыворотки крови)			118 (65—120)	
Аргиназа, активность, усл. ед.		0		
Холинэстераза, *мкмоли* гидролизованного ацетилхолина в минуту, на 100 *мл*			430—685	
Витамины				
Биотин, *мкг* на 100 *мл*	1,25			
Витамин B_{12}, *мкг* на 100 *мл*	0,23 (0,22—0,23)			
Инозит	6,6			
Парааминобензойная кислота, *мкг* на 100 *г*	0,29			
Пиридоксин, *мкг* на 100 *мл*	42			
Гормоны и биологические активаторы				
Прогестерон, *мкг* на 100 *мл*		500—1000		

Вещество	Цельная кровь	Плазма	Сыворотка	Эритроциты
Тироидный гормон, *мкг* на 100 *мл*		3–4		
Минеральные вещества				
Магний, *мг-экв* на 1000 *мл*			6,3	9,8
Фосфор неорганический	7,4			

Химический состав крови лягушки

Вещество	Цельная кровь	Плазма	Сыворотка	Эритроциты
Азот и белковые вещества				
Белки плазмы, *г* на 100 *г*		6,5—6,9		
Небелковый азот				
Аммиак, *мг* на 100 *г*, не выше	0,001—0,003			
Углеводы				
Глюкоза	42 (36—49)			
Органические кислоты, спирты, альдегиды, кетоны				
АТФ	5,8 (5,2—6,3)			19,4 (17,6—20,9)
Пигменты				
Гемоглобин, *г* на 100 *мл* крови	7,8			
Ферменты				
Кокарбоксилаза, *мкг* на 100 *мл*	9,0			
Витамины				
Тиамин, *мкг* на 100 *мл*	9,0			
Минеральные вещества				
Калий, *мг-экв* на 1 *л*		4,8		
Кальций, *мг-экв* на 1000 *мл*	3,2			
Магний, *мг-экв* на 1000 *мл*		7,6		
Медь, *мкг* на 100 *мл*	30 (34—40)			
Натрий, *мкмоли* на 1 *л*		105		
Сера, *мкмоли* SO_4 на 1 *кг*		1,9		
Фосфор неорганический, *мг* на 100 *мл*	5,1			6,0

Иониты отечественного производства и соответствующие иностранные марки*

Отечественные иониты

№ п/п	Марка	Основное сырье	Метод получения	Активные группы	Размер зерна, мм
		Катиониты			
1	КБ-4	Метакриловая кислота, дивинилбензол	Полимеризация	Карбоксил	0,25—2,0
2	КБ-4П-2	Метилметакриловая кислота, дивинилбензол	То же	—	0,25—2,0
3	КУ-2	Стирол, дивинилбензол, хлорсульфоновая кислота	»	Сульфо	0,25—2,0
4	КУ-1	Сульфофенольная кислота, формальдегид	Конденсация	Сульфо и гидроксил	0,25—2,0
5	КУ-5	Полинафталинсульфокислота, формальдегид	»	Сульфо	0,3—2,0
6	КФУ	Фенол, монохлоруксусная кислота, формальдегид	»	Карбоксил гидроксил	0,2—1,0
7	СБС	Стиролбутадиеновый каучук—сульфокислота	Полимеризация	Сульфо	0,3—1,5
8	СГ-1	Метакриловая кислота	То же	Карбоксил	0,8—2,0
9	СДВ	Стирол, дивинилбензол	»	Сульфо	0,35—1,5
		Аниониты			
10	АВ-17	Стирол, дивинилбензол, хлорметиловый эфир триметиламина	Полимеризация	Четвертичное аммониевое основание	0,3—2,0
11	АН-2Ф	Метилольные производные фенола, полиэтиленполиамин, формальдегид	Конденсация	Вторичные и третичные амины	0,3—2,0
12	АН-9	Фенол, формальдегид	То же	То же	0,3—2,0
13	АН-1	Меламин, формальдегид	»	»	0,3—2,0
14	АН-18	Стирол, дивинилбензол	Полимеризация	Третичные амины	0,3—2,0
15	ЭДЭ-10П	Полиэтиленполиамин, эпихлоргидрин	Конденсация	Вторичные и третичные амины и четвертичное аммониевое основание	0,25—1,7

Иностранные иониты

Марка	Основное сырье	Метод получения	Активные группы	Размер зерна, мм	Где производится
		Катиониты			
Пермутит «С»	Резорциловая кислота	Полимеризация	Карбоксил	0,3—0,5	ФРГ
Вофатит «С»	Акриловая кислота, дивинилбензол	То же	»	0,3—0,5	ГДР
Амберлит 50	То же	»	»	0,5—2,0	США
Катекс ROA	Резорцин, монохлоруксусная кислота	»	»	—	Чехословакия
Амберлит-120	Стирол, дивинилбензол	»	Сульфо	0,4—0,6	США
Дауэкс-50		»	»	0,3—0,6	США
Амберлит 100	Фенол, формальдегид	Конденсация	Сульфо и гидроксил		США
Дауэкс-30	То же	»	»	0,3—2,5	США
Вофатит «Р»	»	»	»	0,3—2,5	ГДР
Вофатит-К	»	»	»	0,3—1,5	ГДР
Катекс ROA	Резорцин, монохлоруксусная кислота	Полимеризация	Карбоксил, гидроксил	—	Чехословакия
—	—			—	-
—				-	
Дауэкс 50	Стирол, дивинилбензол	Полимеризация	Сульфо	0,3—0,6	США
		Аниониты			
Амберлит-400	Стирол, дивинилбензол	Полимеризация	Четвертичное аммониевое основание	—	США
Дауэкс-1	То же	То же	То же	—	США
Амберлит-4В	Полиэтилен, полиамин, фенол, формальдегид	Конденсация	Вторичные и третичные амины	0,4—0,6	США
Вофатит-М	То же	»		0,3—2,5	ГДР
—	-		—	—	—
Вофатит	Фенол, формальдегид	»	»	—	ГДР
Нальцит	Стирол, дивинилбензол	Полимеризация	Третичные амины	0,4—0,6	США
Дауэкс-3	То же	То же	То же	0,4—0,6	США
Вофатит-165	Полиэтиленполиамин, эпихлоргидрин	Конденсация	Третичные амины и четвертичное аммониевое основание		ГДР

* По Б. И. Чумбуридзе. Диссертация. Тбилиси, Мединститут, 1963.

Иониты отечественного производства и

№ п.п	Отечественные иониты: Марка	Основное сырье	Метод получения	Активные группы	Размер зерна, *мм*
		Катиониты			
1	КБ-4	Метакриловая кислота, дивинилбензол	Полимеризация	Карбоксил	0,25 -2,0
2	КБ-4П-2	Метилметакриловая кислота, дивинилбензол	То же	—	0,25—2,0
3	КУ-2	Стирол, дивинилбензол, хлорсульфоновая кислота	»	Сульфо	0,25—2,0
4	КУ-1	Сульфофенольная кислота, формальдегид	Конденсация	Сульфо и гидроксил	0,25—2,0
5	КУ-5	Полинафталин сульфокислота, формальдегид	»	Сульфо	0,3—2,0
6	КФУ	Фенол, монохлоруксусная кислота, формальдегид	»	Карбоксил гидроксил	0,2—1,0
7	СБС	Стиролбутадиеновый каучук—сульфокислота	Полимеризация	Сульфо	0,3—1,5
8	СГ-1	Метакриловая кислота	То же	Карбоксил	0,8—2,0
9	СДВ	Стирол, дивинилбензол	»	Сульфо	0,35—1,5
		Аниониты			
10	АВ-17	Стирол, дивинилбензол, хлорметиловый эфир триметиламина	Полимеризация	Четвертичное аммониевое основание	0,3—2,0
11	АН-2Ф	Метилольные производные фенола, полиэтиленполиамин, формальдегид	Конденсация	Вторичные и третичные амины	0,3—2,0
12	АН-9	Фенол, формальдегид	То же	То же	0,3—2,0
13	АН-1	Меланин, формальдегид	»	»	0,3—2,0
14	АН-18	Стирол, дивинилбензол	Полимеризация	Третичные амины	0,3—2,0
15	ЭДЭ-10П	Полиэтиленполиамин, эпихлоргидрид	Конденсация	Вторичные и третичные амины и четвертичное аммониевое основание	0,25—1,7

* По Б. И. Чумбуридзе. Диссертация. Тбилиси, Мединститут, 1963.

соответствующие иностранные марки*

Иностранные иониты					
Марка	Основное сырье	Метод получения	Активные группы	Размер зерна, *мм*	Где производится
Катиониты					
Пермутит «С»	Резорциловая кислота	Полимеризация	Карбоксил	0,3—0,5	ФРГ
Вофатит «С»	Акриловая кислота дивинилбензол	То же	»	0,3—0,5	ГДР
Амберлит-50	То же	»	»	0,5—2,0	США
Катекс ROA	Резорцин, минохлоруксусная кислота	»	»	—	Чехословакия
Амберлит-120	Стирол, дивинилбензол	»	Сульфо	0,4—0,6	США
Дауэкс-50		»	»	0,3—0,6	США
Амберлит-100	Фенол, формальдегид	Конденсация	Сульфо- и гидроксил	—	США
Дауэкс-30	То же	»	»	0,3—2,5	США
Вофатит «Р»	»	»	»	0,3—2,5	ГДР
Вофатит-К	»	»	»	0,3—1,5	ГДР
Катекс ROA	Резорцин, монохлоруксусная кислота	Полимеризация	Карбоксил, гидроксил	—	Чехословакия
—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—
Дауэкс-50	Стирол, дивинилбензол	Полимеризация	Сульфо	0,3—0,6	США
Аниониты					
Амберлит-400	Стирол, дивинилбензол	Полимеризация	Четвертичное аммониевое основание	—	США
Дауэкс-1	То же	То же	То же	—	США
Амберлит-4В	Полиэтилен, полиамин, фенол, формальдегид	Конденсация	Вторичные и третичные амины	0,4—0,6	США
Вофатит-М	То же	»		0,3—2,5	ГДР
—	—	—	—	—	—
Вофатит	Фенол, формальдегид	»	»	—	ГДР
Налцит	Стирол, дивинилбензол	Полимеризация	Третичные амины	0,4—0,6	США
Дауэкс-3	То же	То же	То же	0,4—0,6	США
Вофатит-165	Полиэтилен-полиамин, эпихлоргидрин	Конденсация	Третичные амины и четвертичное аммониевое основание		ГДР

ОГЛАВЛЕНИЕ

Часть III

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Владимир Самсонович Асатиани

Ферментные методы анализа

Утверждено к печати Институтом фармакохимии Академии наук Грузинской ССР


Редактор *Э. Д. Михлин*. Редактор издательства *Л. Н. Кузьминова*.
Художник *Н. Б. Старцев*. Технический редактор *О. Г. Ульянова*

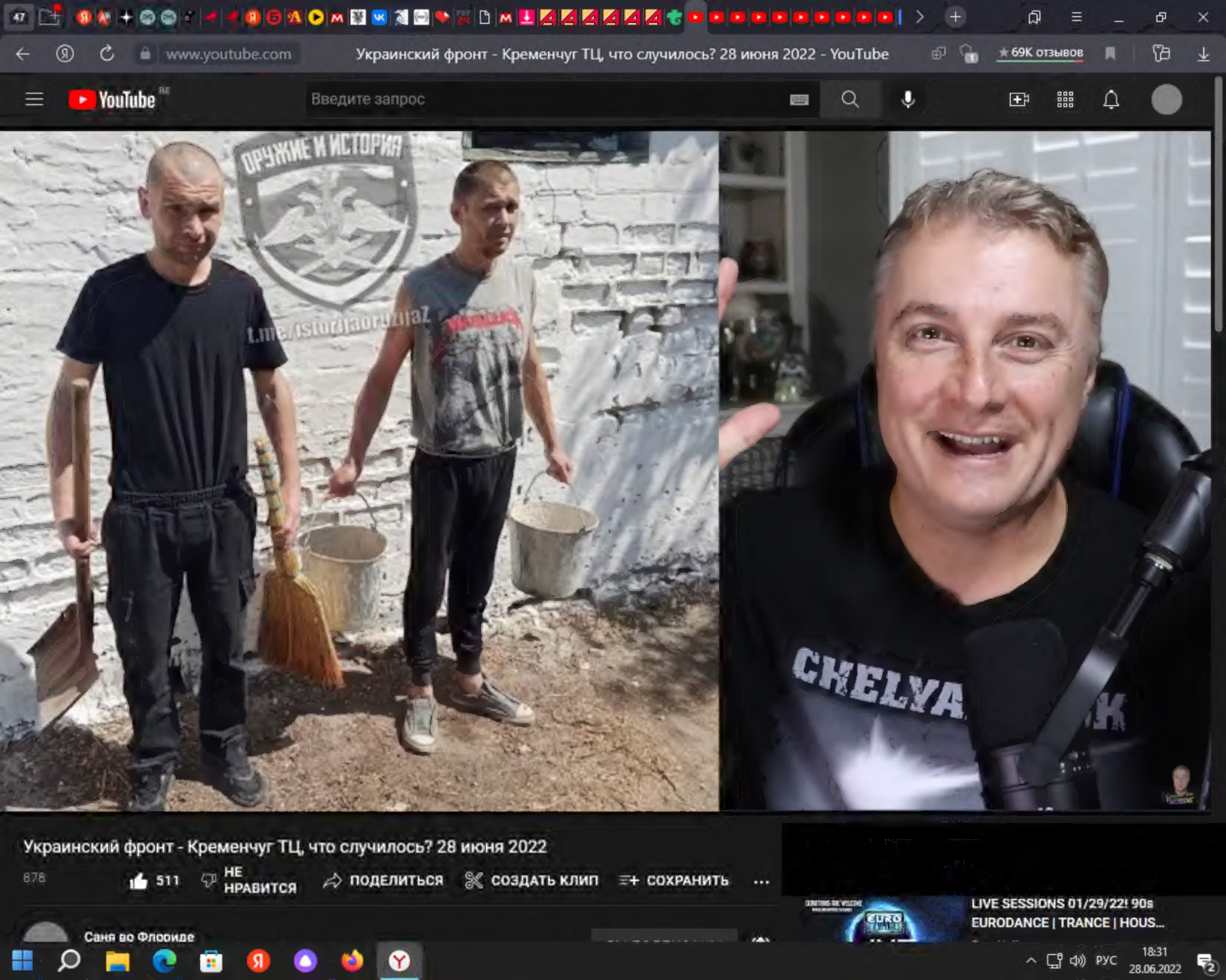
Сдано в набор 30/IX. 1968 г. Подписано к печати 25/IV 1969 г.
Бумага № 2 Усл. печ. л. 46,25 Уч.-изд. л. 46,6 Формат 60×90[1]/16
Т-06461 Тип. зак. 1371 Тираж 7000
Цена 3 р.

Издательство «Наука» Москва К-62, Подсосенский пер., 21

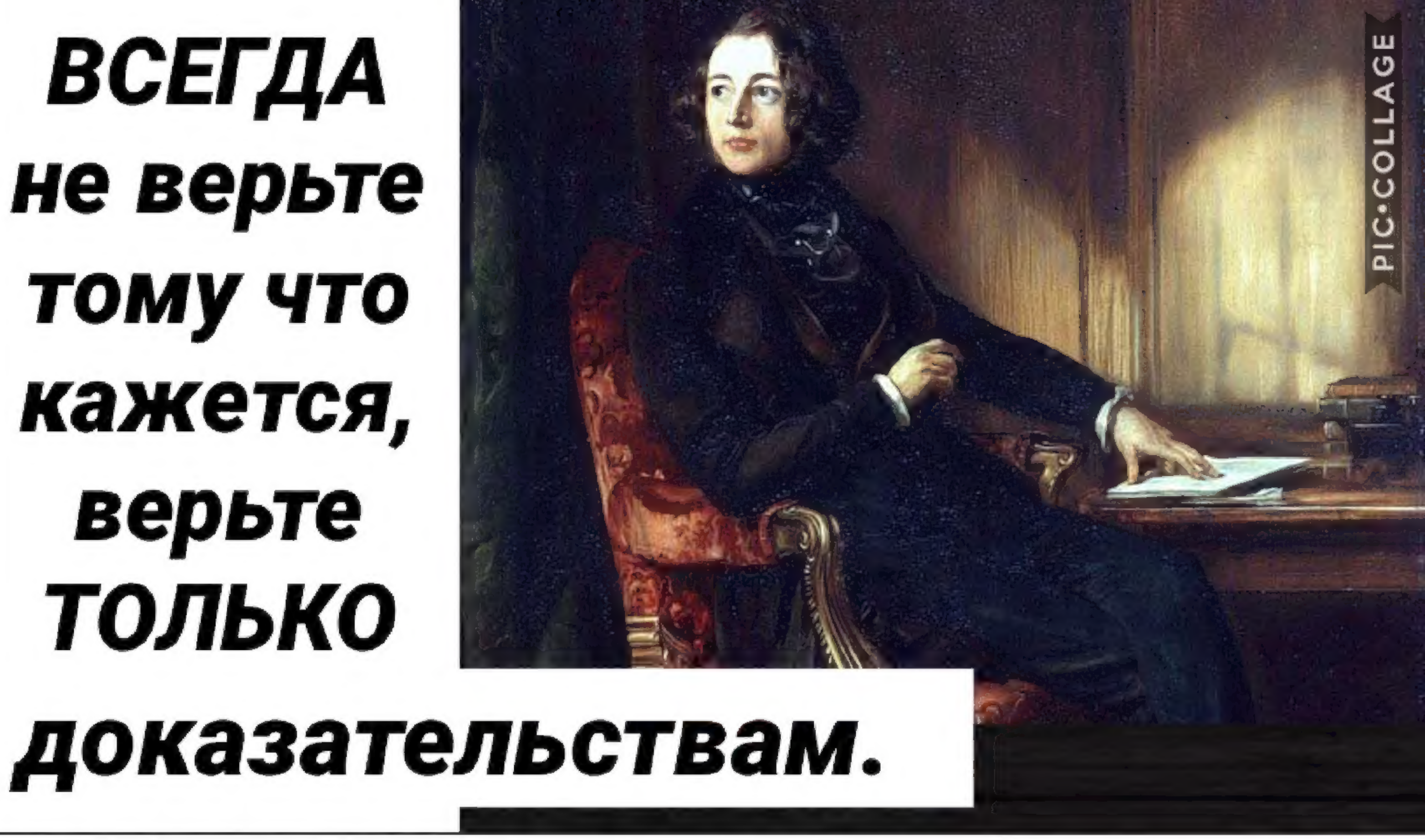
2-я типография издательства «Наука» Москва Г-99, Шубинский пер., 10


3 руб.


Ферментные методы анализа
В.С. АСАТИАНИ



www.youtube.com
Украинский фронт - Кременчуг ТЦ, что случилось? 28 июня 2022 - YouTube
69К отзывов
YouTube
Введите запрос
ОРУЖИЕ И ИСТОРИЯ
t.me/istorijaoruzijaZ
CHELYA
Украинский фронт - Кременчуг ТЦ, что случилось? 28 июня 2022
878
511
НЕ НРАВИТСЯ
ПОДЕЛИТЬСЯ
СОЗДАТЬ КЛИП
СОХРАНИТЬ
LIVE SESSIONS 01/29/22! 90s
EURODANCE | TRANCE | HOUS...
Саня во Флориде
РУС
18:31
28.06.2022



Чарльз Диккенс. «Большие надежды» 1861 г.